

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
JIMMY BEAULIEU

RÉGULATION DE LA NEURO-INFLAMMATION DANS LES  
CELLULES MICROGLIALES PAR L'ACIDE PALMITIQUE,  
L'ACIDE OLÉIQUE ET L'OLEUROPÉINE

OCTOBRE 2018

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, la finalité d'un projet de recherche que j'ai mené pendant près de deux ans. Tout d'abord, je remercie Dre Maria-Grazia Martinoli, directrice de ce projet de maîtrise, pour le temps qu'elle m'a consacré au travers son aide et ses conseils. Dre Maria-Grazia Martinoli est énormément dévouée pour ses étudiants et extrêmement à leur écoute.

Je tiens à remercier également ma collègue Justine Renaud de m'avoir transmis ses connaissances dans le domaine de la neurobiologie et pour la formation pratique qu'elle m'a prodiguée. Un grand merci également à la Dre Linda M. Williams (U. Aberdeen, Écosse) et Dr Dominico Segi (U. Adelaide, Australie) pour les échanges et discussions précieuses. Je remercie aussi la Dre Hélène Glémet qui est la co-directrice de ce projet, elle a contribué au déroulement de ce projet par le matériel prodigué.

Finalement, un grand merci à mon copain, ma famille et mes amis pour leur encouragement et leur support.

## RÉSUMÉ

Depuis les années 90, plusieurs recherches scientifiques ont permis de faire le lien entre les maladies neurodégénératives et la neuro-inflammation. En effet, il a été démontré que la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives, telles la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, est médiée par la neuro-inflammation, qui elle est générée en grande partie par la microglie activée. Celle-ci est composée de cellules immunitaires du cerveau qui, une fois activées, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. L'activation des cellules microgliales, soutenue ou incontrôlée, entraîne une inflammation chronique qui peut induire des dommages neuronaux importants, comme une perte graduelle des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée caractéristique dans la maladie de Parkinson ou la perte graduelle de neurones cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer. En parallèle, depuis les vingt dernières années, des études ont montré que, dans plusieurs types de cellules de l'immunité périphérique, l'acide palmitique, l'acide gras saturé le plus fréquent dans l'alimentation, active l'inflammation et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Étant donné que l'acide palmitique peut traverser la barrière hémato-encéphalique et se retrouver dans le système nerveux central, mon projet de maîtrise visait à vérifier l'hypothèse que l'acide palmitique induit de la neuro-inflammation comparable à celle engendrée par l'administration d'une toxine inflammatoire bien connue, l'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide, dans un système de cellules nerveuses en culture. Également, mon projet visait à vérifier une deuxième hypothèse, soit que les voies de signalisation de ces deux molécules ont des éléments en commun, c'est-à-dire que l'acide palmitique active les marqueurs de transcriptions NF- $\kappa$ B et AP-1 via le *toll-like receptor* 4. Ainsi, grâce aux techniques d'immunobuvardage de type western et d'ELISA, nous avons démontré que l'acide palmitique peut directement augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires dans un système de cellules gliales en culture. De plus, nous avons illustré que les voies de signalisation de l'acide palmitique et LPS partagent des éléments communs, telles que l'activation des marqueurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 via le récepteur *toll-like* 4. Enfin, nous avons démontré que l'acide oléique, un acide gras mono-insaturé, et l'oleuropéine, un polyphénol, tous deux présents dans l'huile d'olive, peuvent diminuer l'inflammation induite par l'acide palmitique. Ces résultats sont importants pour établir que l'acide palmitique peut interférer dans l'homéostasie cellulaire du système nerveux central et suggèrent fortement qu'une alimentation riche en acide palmitique pourrait induire une inflammation et éventuellement favoriser le développement de maladies neurodégénératives.

**Mots-clés :** Acide palmitique, acide oléique, oleuropéine, inflammation, neuro-inflammation, neuroprotection, microglie, acides gras, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, nutrition

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système immunitaire du cerveau .....	2
1.1.1 La barrière hémato-encéphalique.....	2
1.1.2 Les cellules de la neuroimmunité .....	4
1.1.2.1 Les astrocytes.....	6
1.1.2.2 Les oligodendrocytes .....	7
1.1.2.3 Les neurones .....	8
1.1.2.4 La microglie.....	9
1.1.2.5 Les cellules de défense périphériques.....	12
1.1.3 L'activation de la microglie.....	14
1.1.3.1 Activation par les pathogènes.....	14
1.1.3.2 Activation par les cytokines.....	18
1.2 La neuro-inflammation et les maladies neurodégénératives .....	21
1.2.1 La maladie d'Alzheimer .....	22
1.2.2 La maladie de Parkinson.....	24
1.3 Les acides gras.....	27
1.3.1 Les acides gras saturés.....	29
1.3.1.1 L'huile de palme et l'acide palmitique .....	31
1.3.1.2 Rôle inflammatoire de l'acide palmitique au niveau des tissus périphériques.....	33
1.3.1.3 Rôle inflammatoire des acides gras saturés au niveau du tissu nerveux .....	35
1.3.1.4 Rôle inflammatoire de l'acide palmitique dans les cellules nerveuses.....	37

1.3.2	Les acides gras insaturés.....	38
1.3.2.1	L'acide oléique (OA).....	41
1.3.2.2	Le rôle anti-inflammatoire de l'acide oléique .....	43
1.4	L'oleuropéine (OLE) .....	45
1.5	Modèles expérimentaux.....	47
1.5.1	Les cellules microgliales N9.....	47
1.5.2	L'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide (LPS).....	47
1.6	Les objectifs de recherche de ma maîtrise .....	48

## CHAPITRE II

### RÉGULATION DE LA NEURO-INFLAMMATION DANS LES CELLULES MICROGLIALES PAR L'ACIDE PALMITIQUE, L'ACIDE OLÉIQUE ET L'OLEUROPEINE ..... 50

2.1	Contribution des auteurs.....	50
2.2	Résumé de l'article .....	50
2.3	Article scientifique.....	52
	Abstract.....	53
	Introduction.....	53
	Materials and methods.....	55
	Drugs and Chemicals .....	55
	Fatty acid preparation .....	56
	Cell culture and treatments .....	56
	MTT assay .....	57
	ELISA .....	57
	Measures of protein expression by western blot.....	57
	Statistical analysis.....	58
	Results .....	58
	PA but not OA increase cytokines release.....	58
	PA induces cytokine release from microglial cells as compared to LPS.....	60
	Oleuropein, a soluble polyphenol, reduces TNF alpha secretion .....	61
	Inhibitors of JNK, NF- $\kappa$ B and TLR4 pathways, prevent PA-induced cytokine release.....	62

PA but not OA increases expression of microglial cells pro-inflammatory markers, iNOS and COX-2 .....	63
Inhibitors of JNK, NF- $\kappa$ B and TLR4 pathways all prevent PA-induced transcription factors expression .....	65
Discussion.....	66
Acknowledgements.....	69
References.....	70
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>74</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>86</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schématisation de la BHE .....	3
1.2	Principales structures dérivées de la zone du manteau du tube neural .....	4
1.3	Interaction entre les neurones et les cellules gliales dans un contexte de neuro-inflammation.....	5
1.4	Phénotypes des cellules microgliales.....	11
1.5	Schématisation moléculaire de la neuro-inflammation induite par le LPS, les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant .....	17
1.6	Mécanismes inflammatoires impliqués dans la MA .....	24
1.7	Mécanismes inflammatoires impliqués dans la MP.....	27
1.8	Structure générale d'un acide gras .....	28
1.9	Structure de différents acides gras saturés .....	29
1.10	Structure de PA (C16 :0).....	32
1.11	Mécanisme d'action de PA dans les adipocytes .....	35
1.12	Mécanisme des actions non-génomiques de PA lié à l'albumine dans des neuroblastes <i>in vitro</i> .....	38
1.13	Structure de différents acides gras insaturés .....	39
1.14	Métabolisme des oméga-6 et oméga-3 .....	41
1.15	Structure de l'OA (C18 :1 n-9) .....	42
1.16	Métabolisme des oméga-9 chez l'homme.....	42
1.17	Métabolisme d'OA dans les adipocytes et les macrophages .....	44
1.18	Dérivés de l'OLE dans l'huile d'olive .....	46
1.19	Mécanisme d'action d'OLE .....	46
1.20	Cellules microgliales N9 .....	47
1.21	Structure du LPS .....	48



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AG</b>	Acide gras
<b>AGI</b>	Acide gras insaturé
<b>AGMI</b>	Acide gras monoinsaturé
<b>AGPI</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>AGS</b>	Acide gras saturé
<b>AP-1</b>	Protéine activatrice 1
<b>APP-<math>\beta</math></b>	Protéine précurseur du $\beta$ -amyloïde
<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -amyloïde
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>COX</b>	Cyclooxygénase
<b>CR</b>	Récepteur au complément
<b>CREB</b>	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
<b>CSF</b>	<i>Colony stimulating factor</i>
<b>CSF1R</b>	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
<b>CTLA</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>Fc</b>	Fragment cristallisable
<b>BDNF</b>	<i>Glial derived neurotrophic factor</i>
<b>GM-CSF</b>	CSF granulocyte/macrophage
<b>GPCR</b>	<i>G protein-coupled receptors</i>
<b>HSP72</b>	Protéine de choc thermique 72
<b>ICAM-1</b>	Molécule d'adhérence intercellulaire
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL</b>	Interleukine
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>

<b>JAM</b>	<i>Junctional adhesion molecules</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>LRP</b>	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MARCO</b>	<i>Macrophage receptor containing a collagenous domain</i>
<b>M-CSF</b>	CSF multipotentiel
<b>MedDiet</b>	Diète méditerranéenne
<b>MP</b>	Maladie de Parkinson
<b>MPAK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>OA</b>	Acide oléique
<b>OLE</b>	Oleuropéine
<b>PA</b>	Acide palmitique
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
<b>Poly I-C</b>	Acide polyinosinique-polycytidylique
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>RAGE</b>	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
<b>ROS</b>	Dérivé toxique de l'oxygène
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNpc</b>	Substance noire <i>pars compacta</i>
<b>SR</b>	<i>Scavenger receptors</i>
<b>TGF</b>	Facteur de croissance transformant
<b>Th</b>	<i>T helper cell subtype</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>VCAM-1</b>	Molécule d'adhérence cellulaire vasculaire
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>
<b>ZO</b>	<i>Zonula occludens protein</i>

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

Le système nerveux central (SNC) a longtemps été considéré comme un site immunoprivilégié à cause de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, il semblait dissimulé du système immunitaire par le peu d'expression des produits du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et l'absence de drainage lymphatique (Renaud et al. 2015). Cependant, au cours des dernières décennies, l'accumulation d'évidences scientifiques impressionnantes a fait s'écrouler ce modèle. En effet, de nombreuses manifestations du système immunitaire peuvent être mises en évidence aussi dans le SNC, notamment lors de maladies auto-immunes, de maladies inflammatoires, lors de simples lésions du tissu nerveux central ou encore après injection d'une puissante immunotoxine bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS) (Wen et al. 2017; Shabab et al. 2017).

Aujourd'hui, il est clair que même si l'accès de l'immunité périphérique au SNC est restreint et étroitement contrôlé par la BHE, le SNC possède son propre arsenal pour se prémunir et réagir face à une variété de stimuli. La tâche est laborieuse pour le SNC, car il doit en permanence jongler entre les conséquences néfastes liées à une infection et celles proactives liées au déclenchement d'une réaction inflammatoire. Le SNC a donc évolué pour éviter au maximum le déclenchement de mécanismes cellulaires inflammatoires dont les conséquences ne sont pas contrôlables. Cette façon unique de gérer l'inflammation ainsi que les premières étapes de la réaction immunitaire, à travers un drainage soluble plutôt que cellulaire, tient aux propriétés particulières des différentes composantes du parenchyme nerveux. S'il n'y a maintenant plus de doute quant à l'existence d'une réaction inflammatoire dans le SNC, et à l'utilisation de la signalisation des cytokines et chimiokines pour contrôler ses actions (Galic, Riazi, and Pittman 2012), force est aussi de constater que la réaction inflammatoire du SNC se

comporte de façon suffisamment différente de son homologue périphérique pour mériter l'appellation particulière de « neuro-inflammation ».

## 1.1 Le système immunitaire du cerveau

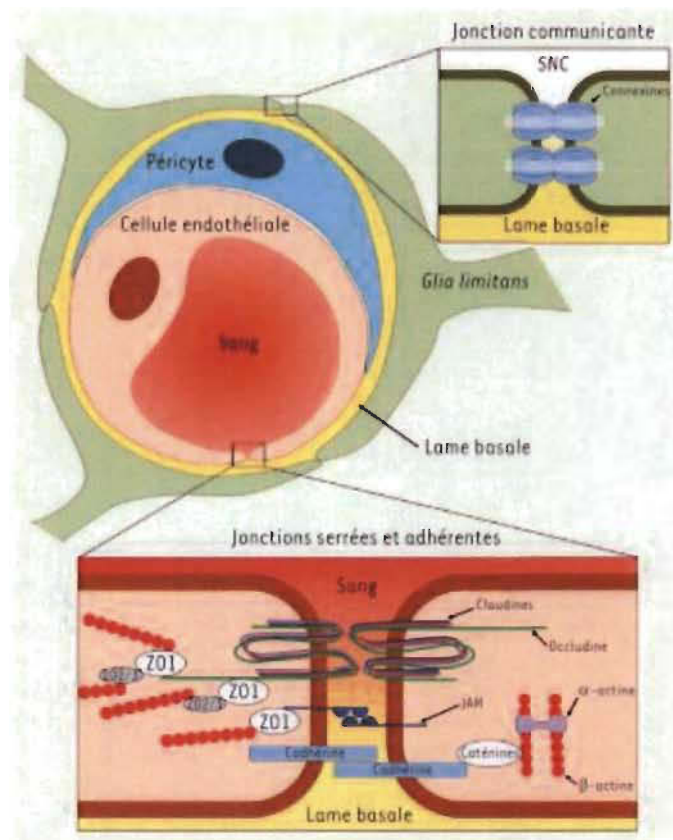
### 1.1.1 La barrière hémato-encéphalique

Première protection du SNC, la BHE est une barrière physiologie, à composante cellulaire, dans le cerveau et la moelle épinière séparant le parenchyme cérébral de la circulation sanguine. Elle permet le maintien de l'homéostasie cérébrale et offre une protection contre les agents pathogènes circulants. En effet, dans le SNC, les cellules endothéliales des capillaires du SNC sont non fenestrées, contrairement à la majorité des cellules endothéliales périphériques. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées constituées de protéines transmembranaires telles que les occludines, les claudines et JAM (*junctional adhesion molecules*) (Figure 1.1). Les jonctions adhérentes sont assurées par l'interaction entre des protéines transmembranaires, les cadhérines. Ces dernières sont à leur tour liées au cytosquelette à l'aide de protéines adaptatrices, telles que ZO1, ZO2 (*zonula occludens protein 1 et 2*) et des caténines. En somme, les conséquences sont d'une part une absence de flux intercellulaire due aux jonctions serrées et d'autre part un flux transcellulaire réduit (Renaud et al. 2015; Daneman and Prat 2015).

De plus, la lame basale des capillaires sanguins, entourant les cellules endothéliales, constitue un rempart supplémentaire. Elle assure un support physique pour l'arrimage et la migration de certaines cellules par l'expression d'intégrines. Également, elle agit comme barrière contre le passage de cellules ou de macromolécules indésirables de par sa constitution matricielle composée de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes et de fibronectine.

Quant aux péricytes, ils sont distribués sur 20 à 30 % de la surface des cellules endothéliales et régulent leur différenciation et leur prolifération. Grâce aux propriétés contractiles de leurs projections cellulaires qui entourent les cellules endothéliales, ils peuvent modifier le diamètre des vaisseaux sanguins en réponse à l'activité neuronale.

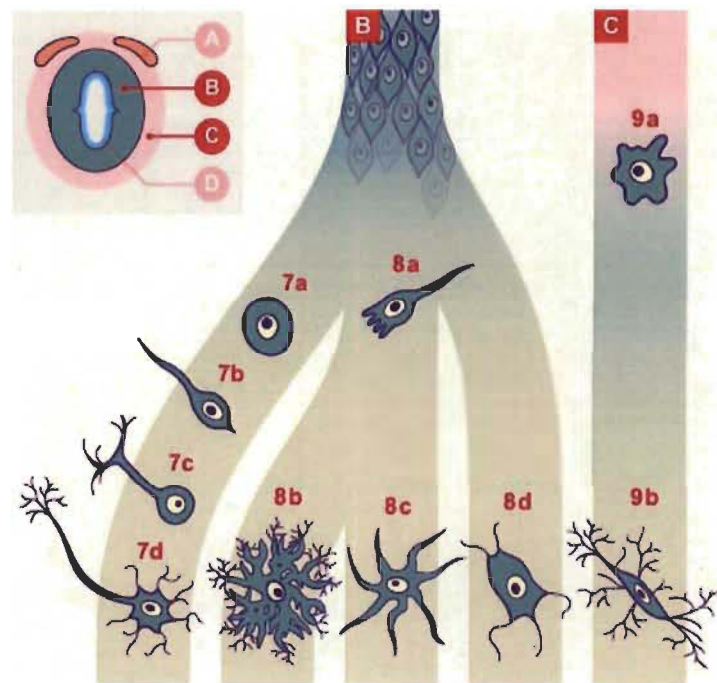
Finalement, la *glia limitans* vient compléter la BHE en recouvrant plus de 99 % de la surface des capillaires du SNC (Figure 1.1). Les pieds astrocytaires qui la forment sont reliés entre eux par des jonctions communicantes et adhérentes. La *glia limitans* régule la morphologie et la perméabilité de la BHE en contrôlant l'expression de certaines protéines des cellules endothéliales. De manière intéressante, il a été démontré que les astrocytes sont capables de restaurer les propriétés des cellules endothéliales cérébrales *in vitro*, ce qui pourrait être dû à des facteurs solubles tels que TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor  $\beta$ 1*), GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), bFGF (*fibroblast growth factor*) (Ramsauer, Krause, and Dermietzel 2002).



**Figure 1.1** Schématisation de la BHE (Renaud et al. 2015).

### 1.1.2 Les cellules de la neuroimmunité

Deuxième protection du SNC, les cellules gliales, qui participent à l'environnement des neurones et sont capables d'immunité dynamique. D'abord, les cellules gliales (glioblastes) apparaissent pendant le développement embryonnaire, après les neuroblastes, mais avant les cellules gliales radiaires, puisque ces dernières apparaissent même avant la fin de la neurogenèse (Figure 1.2). Autrefois, on pensait la fonction des cellules gliales réduite au maintien et au support des neurones. Depuis les années 1990, cette vision est révolue et il est maintenant bien établi que ces cellules contribuent à plusieurs autres fonctions, notamment la protection du SNC.



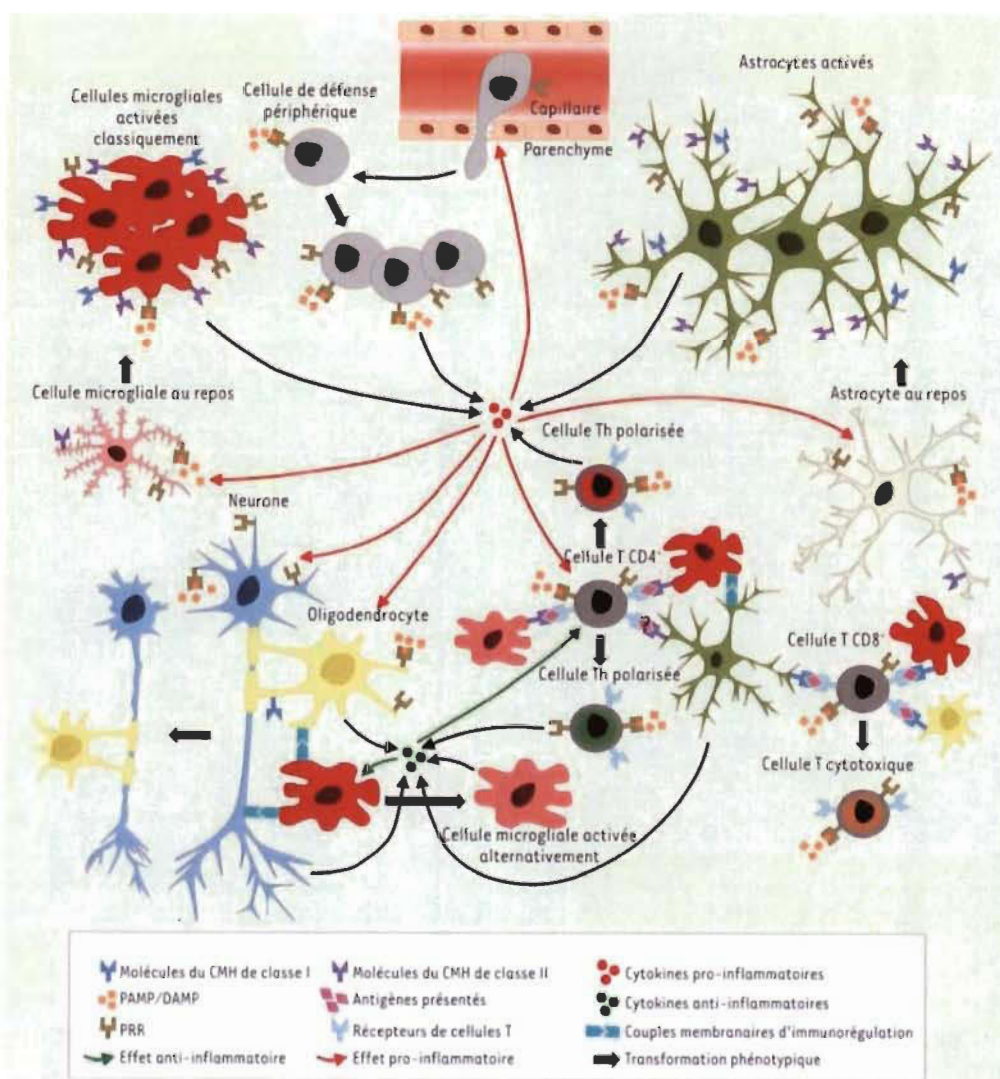
**Figure 1.2 Principales structures dérivées de la zone du manteau du tube neural** (Tirée de <http://www.embryology.ch>).

A) Crête neurale, B) Tube neural, C) Mésenchyme mésodermique, D) Tube neural. 7a) Neuroblaste apolaire, 7b) Neuroblaste bipolaire, 7c) Neuroblaste unipolaire, 7d) Neurone mature, 8a) Glioblaste, 8b) Astrocyte protoplasmique, 8c) Astrocyte fibrillaire, 8d) Oligodendrocyte, 9a) Cellule mésenchymateuse, 9b) Cellule microgiale.

En effet, suite à une insulte, les cellules gliales sont activées et participent à la cicatrisation ou à la réaction immunitaire, c'est le mécanisme de « gliose réactive ».



Il y a alors un changement de leur conformation, une modulation de l'expression des récepteurs cellulaires et la production d'une panoplie de médiateurs inflammatoires. Ainsi, l'immunité cérébrale sera modulée par les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones, mais surtout par les cellules microgliales. En effet, lorsqu'il est question d'inflammation au sein du SNC, c'est la microglie, la cellule résidente à vocation immune du tissu, qu'on accuse d'emblée de débordements. L'accusation est d'autant plus facile puisqu'on la retrouve en tout temps dans les zones enflammées et, qui plus est, avec sa morphologie de cellule « activée » dont il sera question à la sous-sous-section 1.1.2.4 de ce mémoire (Figure 1.3).



**Figure 1.3** Interaction entre les neurones et les cellules gliales dans un contexte de neuro-inflammation (Renaud et al. 2015).

### 1.1.2.1 Les astrocytes

D'origine neuroectodermique, les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC, représentant 40 % de la totalité de la population de cellules gliales (Lee and Suk 2017). Ils participent à la formation et le maintien de la *glia limitans* de la BHE grâce à leurs extensions cytoplasmiques, régulent le flux sanguin, assurent l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique du SNC, participent à la neurotransmission, à la détoxification du milieu extracellulaire notamment par capture du glutamate, et maintiennent la balance ionique du milieu extracellulaire. Les astrocytes sont également bien outillés pour assister la microglie dans sa fonction de sentinelle et de défense immunitaire (Farina, Aloisi, and Meinl 2007; Gimsa, Mitchison, and Brunner-Weinzierl 2013). Ils expriment le *toll-like receptor* (TLR) 3 de façon constitutive et peuvent être stimulés pour exprimer plusieurs *pattern recognition receptor* (PRR), ils sont donc aptes à reconnaître et à réagir à un large éventail de situations dangereuses auquel est soumis le SNC (Renaud et al. 2015).

Lors de leur activation, les astrocytes deviennent hypertrophiques, prolifèrent et modifient leur expression génique. Ils sécrètent un bon nombre de facteurs pro-inflammatoires servant à attirer les cellules de défense périphériques et à faciliter leur migration dans le parenchyme cérébral (Figure 1.3). Ils expriment des récepteurs éboueurs, via lesquels ils contribuent à la phagocytose, et produisent les molécules du CMH de classe II, leur permettant d'activer les lymphocytes T auxiliaires. Leur capacité à présenter des antigènes, comme le fait la microglie, reste cependant controversée. Leur activation les amène à diminuer leur internalisation de glutamate et à perturber le réseau astrocytaire en diminuant la production de connexine 43, ce qui contribue, de surcroît, au caractère neurotoxique de la réaction inflammatoire (Gimsa, Mitchison, and Brunner-Weinzierl 2013).

Bien qu'ils participent à fond aux processus pro-inflammatoires lorsqu'ils sont activés, les astrocytes répondent néanmoins à l'interleukine (IL)-1 $\beta$  par la sécrétion de facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$  et par la libération de différents facteurs



neurotrophiques qui soutiennent la réparation de la BHE, la remyélinisation, le remodelage de la matrice ainsi que la survie des neurones et des oligodendrocytes. Grâce à l'expression du récepteur immunorégulateur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et l'expression constitutive du ligand de Fas, les astrocytes contrôlent l'activation des lymphocytes T et peuvent déclencher l'apoptose des cellules de défense activées respectivement. Lors d'une situation d'inflammation chronique, les astrocytes activent davantage les lymphocytes du sous-type Th2 qui ont un profil plus immunorégulateur que le sous-type Th1 pour le SNC (Jäger et al. 2009). De plus, certains signaux d'agression permettent aux cellules astrocytaires de se différencier en cellules gliales radiaires qui promeuvent la multiplication des cellules souches neuronales et leur migration vers le site de lésion via l'expression d'autres facteurs neurotrophiques (Müller, Snyder, and Loring 2006).

Enfin, les astrocytes sont particulièrement reconnus pour leur rôle dans la formation de la cicatrice gliale. En effet, lorsqu'ils sont activés, ils se multiplient abondamment, circonscrivent le site d'inflammation, occupent les espaces créés par la mort ou la phagocytose de cellules neuronales, et produisent des éléments de la matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique. Bien que cette réaction de défense a pour but d'inhiber la propagation de l'inflammation et d'offrir un effet restructurant, la formation de la cicatrice gliale a comme conséquence d'inhiber la migration et la différenciation des cellules souches neuronales (Müller, Snyder, and Loring 2006).

#### **1.1.2.2 Les oligodendrocytes**

On distingue deux types d'oligodendrocytes : les oligodendrocytes myélinisants, localisés dans la substance blanche où ils forment la gaine de myéline des axones, et les oligodendrocytes satellites, localisés dans la substance grise où ils entourent les somas neuronaux. Les oligodendrocytes partagent la même origine neuroectodermique que les astrocytes et les neurones (Figure 1.2). Ils établissent une relation symbiotique avec les neurones et ils sont essentiels au développement et à la survie des axones (Frühbeis et al. 2013; Wake, Lee, and Fields 2011; Baumann and Pham-Dinh 2001) (Figure 1.3).

Comme les autres cellules du SNC, les oligodendrocytes expriment des PRRs, notamment le TLR2 et TLR3, qui leur permettent de réagir à certains signaux de danger. Les conséquences de l'engagement de ces récepteurs restent à ce jour mal connues, mais elles devraient se répercuter sur l'ensemble du réseau d'influence des oligodendrocytes. En effet, les oligodendrocytes forment un réseau relativement vaste impliquant autant les astrocytes que les neurones, avec lesquels ils sont en lien par le biais de jonctions communicantes ou associés par la gaine de myéline respectivement. Ces cellules peuvent enrober jusqu'à une cinquantaine d'axones distincts (Frühbeis et al. 2013).

Si les oligodendrocytes peuvent participer activement à la mise en place d'une immunité innée par l'intermédiaire de leurs TLRs, ils peuvent aussi être eux-mêmes générateurs de danger. Très sensibles au stress oxydant, tout comme ils le sont à la toxicité du glutamate ou à celle de l'ATP, les oligodendrocytes peuvent causer des dommages sérieux à leur environnement et entretenir l'inflammation sans être nécessairement les cellules initialement visées par l'agression (Renaud et al. 2015).

### ***1.1.2.3 Les neurones***

Les neurones jouent un rôle primordial dans l'établissement de l'immunité du SNC, tant en amont qu'en aval de la réponse (Figure 1.3). D'une part, tout comme les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales, les neurones expriment quelques PRRs, par lesquels ils perçoivent les signaux de danger présents dans leur environnement. De plus, ces cellules expriment plusieurs récepteurs pour les cytokines leur permettant, en situation d'agression, d'ajuster leur participation à l'immunosuppression. Les neurones expriment le récepteur TLR3 qui peut être activé par l'ARN double brin, le PAMP (pour *Pathogen associated molecular patterns*) déclencheur. Lors de sa dimérisation, le TLR3 participe à l'immunité antivirale par l'intermédiaire des interférons (IFNs) de type I, c'est notamment le cas lors d'une infection par le virus neurotrophique de la rage (Renaud et al. 2015).

D'autre part, les neurones agissent en tant que médiateur de l'inflammation, en atténuant les effets pro-inflammatoires de l'imposant arsenal de la microglie. La régulation des cellules microgliales par les neurones implique à la fois des contacts cellule-cellule et des facteurs solubles contribuant à freiner l'inflammation. La majorité de ces protéines sont exprimées de façon constitutive créant d'entrée de jeu un milieu immunosuppresseur capable de contenir les débordements de la microglie. Principalement, ces protéines interfèrent avec les voies de signalisation en inhibant des kinases essentielles, notamment celles de la famille des MPAK (*mitogen-activated protein kinase*) et les Pi3K (*phosphoinositide 3-kinases*). Elles permettent de réduire l'expression de facteurs de transcription comme c-jun ou c-myc, ou d'inhiber leur translocation nucléaire comme Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) ou NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Ainsi, elles contribuent à diminuer la production de cytokines inflammatoires et de dérivés toxiques de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (NO) dès que la microglie se trouve activée. Également, les neurones sont en mesure de contrôler l'apoptose des cellules microgliales activées grâce à l'expression constitutive du ligand Fas. Elles peuvent restreindre l'activation de la microglie via l'expression constitutive de TGF- $\beta$  et la fractalkine soluble, puis amplifier leur production en situation traumatique. De plus, en situation de crise elles peuvent sécréter l'IL-10.

Finalement, les neurones soutiennent également un milieu immunosuppresseur grâce à un grand nombre de neurotransmetteurs et de neurotrophines. Sous l'influence de ces facteurs immunorégulateurs, les cellules microgliales produisent moins de cytokines inflammatoires, diminuent leur stress oxydant et réduisent l'expression de molécules du CMH. Ainsi, la microglie supporte moins l'activation des cellules de défense périphériques ayant accédé au parenchyme nerveux (Renaud et al. 2015).

#### **1.1.2.4 La microglie**

La microglie constitue en moyenne 5 à 20 % de l'ensemble des cellules gliales (Lee and Suk 2017). Les cellules microgliales sont originaires du sac vitellin, à partir

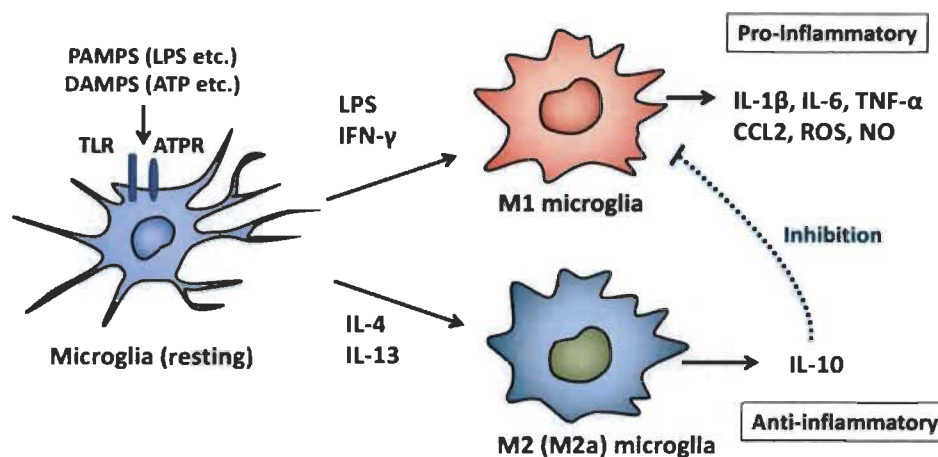
d'un précurseur érythromyéloïde CSF1R+ (*colony stimulating factor 1 receptor*) commun aux macrophages résidents (Gomez Perdiguero et al. 2014). Très tôt, elles colonisent le neuroépithélium où elles poursuivent leur différenciation dans l'environnement particulier du SNC. Tout au long de la vie, elles conservent un pouvoir de régénération qui leur permet à la fois de maintenir leur population et de répondre aux demandes ponctuelles (Ajami et al. 2007). Après la naissance, une sous-population de cellules microgliales semblerait dérivée de source hématopoïétique par l'infiltration de monocytes dans le parenchyme neuronal (Chen et al. 2010).

Les cellules microgliales sont dotées d'un très vaste potentiel d'activité. Tout d'abord, elles exercent un rôle primordial dans le développement normal du SNC grâce à leur activité phagocytaire qui permet l'élimination des corps apoptotiques présents en grande quantité et le déclenchement d'apoptose neuronale lors de l'embryogenèse (Streit 2001; Paolicelli et al. 2011). De plus, les cellules microgliales sont essentielles à la structuration du SNC, ainsi qu'à l'exercice des fonctions nerveuses supérieures, un rôle dont on commence à peine à percevoir l'importance (Tremblay et al. 2011). Au niveau du cerveau adulte, les cellules microgliales sont ubiquitaires et elles possèdent des extensions cytoplasmiques qui se chevauchent très peu et se meuvent rapidement. Elles sont en mesure d'explorer leur environnement de manière constante et elles se métamorphosent en fonction des stimuli qu'elles perçoivent. De manière intéressante, il semblerait que l'ensemble du parenchyme cérébral est exploré au moins une fois toutes les 6 heures par les cellules microgliales (Nimmerjahn, Kirchhoff, and Helmchen 2005).

Toutefois, les cellules microgliales sont le mieux connues pour leur implication dans des situations traumatiques où elles assurent la première ligne de défense du SNC. Elles sont particulièrement bien équipées pour percevoir les perturbations de leur environnement, car elles expriment tous les PRRs identifiés à ce jour en plus des récepteurs pour les molécules du complément, Fc (Fragment cristallisable), les cytokines, les chimiokines, les prostaglandines et les récepteurs de mort (Boche, Perry, and Nicoll 2013). La reconnaissance de la perturbation induit le passage de l'état de

repos à celui d'activation, permettant dans un premier temps d'éliminer la source du dérèglement et par la suite de favoriser le remodelage et la régénération.

Les cellules microgliales deviennent activées en présence de divers signaux de danger, notamment un agent pathogène, un tissu endommagé, une stimulation anormale, une neurotoxine, une infection ou une blessure (Hanke and Kielian 2011). Lors de leur activation, elles entreprennent des changements, autant morphologiques que phénotypiques. Elles adoptent un profil amiboïde avec des processus raccourcis qui facilitent à la fois leur division et leur déplacement. Elles sont recrutées soit directement par l'agent pathogène lui-même, soit par des chimiokines libérées par les autres cellules neuronales alertées du danger. Ainsi, les cellules microgliales oscillent entre deux états extrêmes : un état d'activation classique (M1) et un état d'activation alternatif à vocation réparatrice (M2) (Boche, Perry, and Nicoll 2012) (Figure 1.4). Les phénotypes des cellules microgliales, sont principalement déterminés par leur environnement et les stimuli externes auxquels ils répondent (Figure 1.3).



**Figure 1.4** Phénotypes des cellules microgliales (Nakagawa and Chiba 2014).

D'une part, les cellules microgliales activées de **manière classique** arborent un phénotype pro-inflammatoire et souvent de nature neurotoxique. Elles sécrètent un large éventail de cytokines pro-inflammatoires, induisent la polarisation Th1, expriment des chimiokines, iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et COX (cyclooxygénase)-2, produisent des ROS et NO, augmentent l'expression des CMH de classes I et II et des

facteurs de costimulation, sécrètent de la métalloprotéinase matricielle et elles possèdent un pouvoir phagocytaire accru. Également, dans son état pro-inflammatoire, la microglie peut altérer l'étanchéité de la BHE, attirer les leucocytes (lymphocytes, monocytes et granulocytes), faciliter leur déplacement dans la matrice extracellulaire, présenter des antigènes, soutenir l'activation de l'immunité spécifique et mettre hors d'état de nuire les agents perturbateurs. Cependant, elle a aussi le pouvoir de causer des dommages collatéraux souvent irréversibles au SNC. Ce potentiel autodestructeur des cellules microgliales activées est tempéré par les propriétés immunosuppressives du milieu, en grande partie attribuables aux neurones.

D'autre part, dans son **état réparateur**, la microglie arbore plutôt un profil immunomodulateur. Elle privilégie un métabolisme aérobie, augmente de manière accrue l'expression de récepteurs éboueurs, privilégie la synthèse de COX-1 au détriment de COX-2, synthétise l'arginase-1 et sécrète divers facteurs neurotrophiques et d'éléments matriciels. Également, elle favorise l'angiogenèse et stimule la génération de nouveaux oligodendrocytes, astrocytes, voire même de neurones, à partir de cellules souches toujours présentes dans le parenchyme nerveux adulte. Ainsi, elle permet la réparation des tissus lésés et le retour à l'homéostasie (Renaud et al. 2015).

#### ***1.1.2.5 Les cellules de défense périphériques***

En situation normale, peu de leucocytes arrivent à s'échapper du système vasculaire et à entrer dans le SNC. De plus, les cellules de l'immunité périphérique qui entrent dans le SNC, occupent des niches stratégiques sans jamais pénétrer le parenchyme. Elles patrouillent comme elles le font en périphérie et elles possèdent tous les attributs qui leur permettent de réagir efficacement à l'agression (Ransohoff and Engelhardt 2012; Takeshita and Ransohoff 2012; Ousman and Kubes 2012). Bien que leur infiltration soit limitée au sein du SNC, les leucocytes permettent d'assurer une immunosurveillance dont l'importance n'est nullement négligeable si on se réfère aux dommages causés par leur suppression (Ousman and Kubes 2012). En effet, il a été démontré que dans le cas du JC polyomavirus, un virus ubiquitaire chez l'humain, l'arrêt



de l'immunosurveillance dû à des thérapies immunosuppressives, entraîne une leucoencéphalopathie multifocale progressive, une maladie du SNC généralement mortelle (Ousman and Kubes 2012).

En situation d'agression, la BHE devient plus perméable et permet davantage le passage des cellules immunitaires périphériques. D'une part, l'étanchéité de la BHE est modifiée par les cellules du parenchyme qui s'activent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires dans le milieu. D'autre part, les cellules du parenchyme libèrent des chimiokines qui guident les cellules de défense, y compris les granulocytes, et les autorisent à pénétrer au sein même du parenchyme nerveux (Bechmann, Galea, and Perry 2007). Également, les macrophages participent au recrutement des cellules de l'immunité périphérique grâce à la production de facteurs de croissance, la modification des cellules endothéliales, puis par la sécrétion de métalloprotéinases qui facilitent les déplacements (Figure 1.3). Le recrutement de ces cellules dans le SNC est un mécanisme naturel de notre corps pour soutenir la résolution des anomalies et restaurer l'homéostasie du SNC.

Cependant, les cellules de l'immunité périphérique peuvent aussi alimenter la neuro-inflammation et promouvoir des événements neurodégénératifs secondaires. Entre autres, il a été mis en évidence que dans la sclérose en plaques, suite à un traumatisme ou une ischémie, l'infiltration leucocytaire dans le SNC est importante et l'activité de ces cellules est centralisée dans les régions démyélinisées, indiquant un rôle crucial dans la progression de la maladie (Bogie, Stinissen, and Hendriks 2014). Heureusement, pour contrer les risques encourus, les cellules du SNC limitent le temps de vie des cellules de défense en provenance de l'extérieur ou les réorientent vers des phénotypes plus immunorégulateurs, notamment par l'expression constitutive du ligand Fas ou de TGF- $\beta$  dans l'environnement nerveux.

### 1.1.3 L'activation de la microglie

Au niveau d'un cerveau sain, les cellules du parenchyme nerveux promeuvent un environnement immunosuppresseur, afin de préserver l'intégrité des fonctions du cerveau. Tel que discuté précédemment, cette immunosuppression est supportée, entre autres, par le facteur TGF- $\beta$ , l'activité des neurones et la BHE. Toutefois, sous certaines conditions, tel un traumatisme, les cellules immunocompétentes deviennent activées et produisent une panoplie de facteurs médiateurs de l'inflammation. La microglie joue un rôle majeur dans le processus inflammatoire. Elles constituent la première ligne de défense du parenchyme nerveux et son activation incontrôlée peut engendrer de la neurotoxicité (Shabab et al. 2017). Également, il semblerait que les cellules microgliales activées phagocytent non seulement les débris cellulaires, mais aussi les cellules voisines intactes (Kim and Joh 2006). Ainsi, la microglie activée est considérée aujourd'hui comme un important acteur au sein de la progression de plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP).

#### 1.1.3.1 Activation par les pathogènes

Le recrutement des cellules microgliales est possible grâce à la reconnaissance d'une perturbation interne. Cette reconnaissance est assurée par un ensemble de récepteurs solubles, membranaires ou cytosoliques baptisés PRRs, dont on connaît pour le moment une vingtaine de membres (Hyunkyoung et al. 2013). Les récepteurs de l'immunité innée permettent la reconnaissance des pathogènes et du soi modifié (Gordon 2002). Ces récepteurs reconnaissent les PAMPs, telles que des oligosaccharides, des acides nucléiques modifiés et des glycanes. De la même façon, des molécules générées au cours de stress cellulaires non liés aux infections (DAMP pour *damage-associated molecular pattern*) seront reconnues par différents récepteurs de l'immunité innée. Les DAMPs comprennent des protéines agrégées, modifiées ou mal repliées telles l' $\alpha$ -synucléine, la protéine Tau ou le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ), toutes associées à des maladies neurodégénératives. Également, les DAMPs comptent de simples molécules comme l'ATP ou le glutamate. Ces dernières sont abondamment libérées dans le milieu

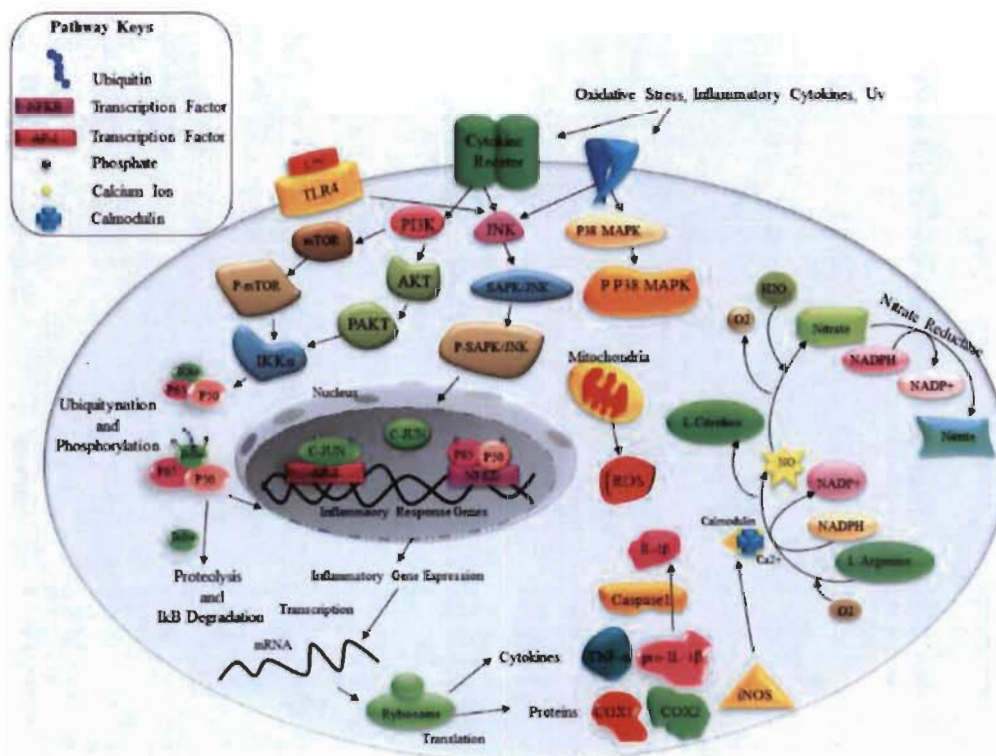


lors de nécroses cellulaires dans le SNC (Tang et al. 2012). Lorsque les PAMPs/DAMPs sont reconnus par leurs récepteurs, il en résulte une cascade de signalisation recrutant des protéines adaptatrices et des kinases (Figure 1.5). Cette cascade aboutit à l'activation de facteurs de transcription, notamment NF- $\kappa$ B et la protéine activatrice 1 (AP-1), qui modifient de façon drastique le phénotype cellulaire de cellules microgliales. Ces modifications se manifestent par l'acquisition de nouveaux récepteurs et par l'expression d'un large éventail de cytokines et de chimiokines. Ces molécules, via des actions autocrines et paracrines, guident les cellules de défense au site de l'agression, permettent le déploiement focalisé des mécanismes de défense (phagocytose, production de ROS, apoptose) et préparent les étapes de la reconstruction. Au contraire de ce qu'on observe en périphérie où l'expression constitutive des récepteurs PRRs est un attribut plutôt spécifique des cellules de la défense innée, on constate que, dans le SNC, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones expriment leur propre répertoire de PRRs par lequel ils contribuent eux aussi à toutes les étapes de la neuro-inflammation.

**Les récepteurs d'épuration** (SR pour *scavenger receptors*) permettent la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines modifiées, ainsi que des cellules apoptotiques, de bactéries ou de substances telles que le peptide A $\beta$ , généré lors de la MA (Mukhopadhyay and Gordon 2004). L'expression de la plupart de ces récepteurs, notamment SR-A, SR-BI, CD36, RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) et MARCO (*macrophage receptor containing a collagenous domain*), a été décrite sur les cellules microgliales (Alarcón et al. 2005). Le récepteur MARCO en plus de ces fonctions d'internalisation, interviendrait également dans le changement de morphologie des cellules microgliales après leur activation (Granucci et al. 2003). Bien que la plupart des récepteurs soient exprimés de manière constitutive par la microglie néonatale, l'expression d'autres récepteurs comme SR-A et SR-BI diminue à l'âge adulte et n'est réinduite qu'en cas d'inflammation. À ce jour, la conséquence de l'engagement des récepteurs d'épuration sur les cellules microgliales a seulement été étudiée au niveau de l'agrégation de protéines formant des plaques A $\beta$  au cours de la MA et celle-ci reste peu caractérisée.

**Les récepteurs de la famille Toll (TLR)**, initialement décrits chez la drosophile, comprennent une dizaine de membres. Les TLRs semblent constituer une des plus anciennes composantes du système immunitaire et seraient apparus avant même la séparation entre les animaux et les végétaux. Ces récepteurs ont été extrêmement conservés et ont évolué pour reconnaître les motifs communs des bactéries, virus, parasites ou champignons. Ils sont exprimés par les cellules immunitaires innées, tels les monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes NK et les lymphocytes B et T (Visintin et al. 2001; Mitsui et al. 2004; Sabroe, Dower, and Whyte 2005; Tang et al. 2012). Ils se situent à la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 11) ou dans la membrane de vésicules intracellulaires (TLR3, 7, 8, 9). Après leur activation, les TLRs induisent une cascade de signalisation intracellulaire via l'adaptateur MyD88, engendrant, l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui permet la synthèse de gènes de cytokines ou de chimiokines (Janssens and Beyaert 2002). Certains récepteurs possèdent des voies indépendantes et aboutissent à l'activation de divers facteurs de transcription. Entre autres, le TLR4 engendre l'activation du facteur de transcription IRF-3 et à la synthèse des membres de la famille des gènes inductibles par l'interféron (IFN) (Oda and Kitano 2006). De plus, les TLRs ont une fonction importante au sein du SNC, dans la mesure où leur expression est rapidement augmentée lors de diverses perturbations du parenchyme nerveux (Kielian 2006). L'expression des TLR3, 4 et 8 a ainsi été mise en évidence dans les neurones (Wadachi and Hargreaves 2006) et tous les TLRs ont été détectés dans les astrocytes avec une expression préférentielle du TLR3 (McKimmie and Fazakerley 2005). Dans les cellules microgliales, les TLR 1 à 9 semblent exprimés constitutivement aussi bien chez la souris (Olson and Miller 2004) que chez l'homme (Jack et al. 2005). Finalement, les agonistes des TLRs sont des activateurs efficaces des cellules microgliales, en particulier l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I-C), le lipopolysaccharide (LPS) (Figure 1.5) et le CpG qui sont des agonistes du TLR3, TLR4 et TLR9 respectivement. Ils induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) ou l'IL-1 $\beta$  et NO ou encore favorisent la fonction de présentation antigénique de la microglie (Olson and Miller 2004).

Les cellules microgliales peuvent être activées par la stimulation des **récepteurs au complément** (CR). Les cellules microgliales expriment de manière constitutive les CR 1, 3 et 4, puis le niveau d'expression est modulé à la hausse suite à l'activation (Rotshenker 2003). Ce système est composé d'un certain nombre de protéines et de protéases activées en cascade. Majoritairement, ces récepteurs vont favoriser la phagocytose des pathogènes ou des débris cellulaires. En outre, il a été démontré que le CR3 (CD11b/CD18), souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales chez la souris, permettrait une reconnaissance directe de certains motifs bactériens, notamment le LPS et par conséquent induirait une activation rapide des cellules l'exprimant (Ehlers 2000). Dans les maladies neurodégénératives, il existe une dérégulation de la voie classique du complément. Des études menées sur des cerveaux de patients atteints de la MA ont révélé une augmentation de l'immunoréactivité de C1q, C3b, C4d, C5b-9, et MAC entourant les plaques séniles (Meraz Rios et al. 2013).



**Figure 1.5** Schématisation moléculaire de la neuro-inflammation induite par le LPS, les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant (Shabab, Khanabdali et al. 2017).

### 1.1.3.2 Activation par les cytokines

Également, l'activation des cellules microgliales peut être régulée par des cytokines présentes dans l'organisme. Les cytokines sont des substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus. Ces molécules essentielles à la communication de nos cellules peuvent avoir une action paracrine ou autocrine. Les cellules microgliales expriment un large éventail de récepteurs pour ces dernières. Six groupes principaux de cytokines sont retrouvés au niveau du SNC, soient les ILs, les TNFs, les IFNs, les chimiokines, puis les CSF (*colony stimulating factors*). Dans la MA et la MP, ces protéines peuvent être importantes dans le développement de la pathologie bien avant l'apparition des premiers symptômes. Des études réalisées sur des tissus de patients atteints de la MA ont révélé des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . Il est bien connu que l'augmentation de ces cytokines est fortement liée à l'activation des cellules microgliales suite à l'exposition aux agrégats A $\beta$  (Meraz Rios et al. 2013). Ce sujet sera plus amplement décrit dans la section 1.2 « La neuro-inflammation et les maladies neurodégénératives » de ce mémoire.

**Les ILs** ont été nommés ainsi, car les premières observations semblaient montrer qu'elles étaient importantes pour la signalisation entre les leucocytes. Tous les ILs ne possèdent pas la même fonction, structure et le même récepteur. La microglie influence la survie des neurones en libérant une panoplie d'ILs qui modulent les fonctions des cellules immunitaires environnantes, et qu'elles sont toxiques pour les neurones ou bénéfiques. Entre autres, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-18 sont reconnues pour leur fonction pro-inflammatoire, tandis qu'IL-4, IL-10 et IL-13 sont plutôt immunosuppressives. L'IL-12 et l'IL-16 jouent un rôle dans le chimiotactisme et la prolifération des lymphocytes T périphériques (Block and Hong 2005). De façon intéressante, il a été démontré *in vivo* que l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  activent un récepteur commun (IL-1R1), puis que le blocage pharmacologique de ce récepteur réduit la neuro-inflammation protégeant les souris de la perte de fonctions cognitives suite à une lésion cérébrale traumatique

(Newell et al. 2018). De plus, une étude a démontré la capacité d'IL-4 et IL-13 d'induire la mort des cellules microgliales activées (Yang et al. 2002).

**Les TNFs** ont été nommés ainsi en raison de leur capacité à induire la mort des cellules tumorales par nécrose. Cependant, aujourd'hui elles sont davantage reconnues pour leur action en tant que modulatrice inflammatoire qu'inductrice de nécrose. Cette famille inclut le TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), autrefois nommée TNF- $\beta$ . Ces dernières possèdent les mêmes propriétés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques. D'ailleurs, il a été démontré que le niveau de TNF- $\alpha$  était fortement augmenté dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien *post-mortem* de patients atteints de la MP. Également, les chercheurs ont illustré la toxicité induite par le TNF- $\alpha$  sur des neurones dopaminergiques de cultures primaires de mésencéphales embryonnaires de rats en démontrant une diminution dose-dépendante des neurones, suite à l'exposition (McGuire et al. 2001). Cette cytokine stimule le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui induit l'expression des molécules pro-inflammatoires et favorise la synthèse de facteurs de survie neuronaux tels que la calrétinine, l'enzyme superoxyde dismutase du manganèse et la protéine Bcl-2 anti-apoptotique (Kamata et al. 2005). Bien que le TNF- $\alpha$  est une cytokine qui peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur différents neurones, il a été démontré que la suppression à long terme de la voie de signalisation du récepteur du TNF- $\alpha$  peut supprimer la capacité microgliale à éliminer efficacement les agrégats de A $\beta$ , favorisant ainsi son agrégation à des stades précoces et sous-tendant la progression des changements neuropathologiques de type Alzheimer (Montgomery et al. 2011).

**Les IFNs** sont des cytokines clés du système immunitaire inné impliquées dans la défense contre les virus, bactéries, parasites et cellules tumorales. L'IFN- $\gamma$ , l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ , sont reconnus pour être des activateurs puissants de la microglie et leur expression est, entre autres, modulée en réponse à l'IL-8 et l'IL-12 (Rock et al. 2005). L'IFN- $\gamma$  permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH I et II, des costimulateurs CD80 et CD86, des CRs, de molécules d'adhérence comme ICAM-1 à la surface de la microglie et potentialise donc leurs fonctions de présentation d'antigènes et de phagocytose. Il entraîne également la synthèse d'autres cytokines par la microglie



comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 et contribue à créer une cascade inflammatoire lors d'une infection (Renaud et al. 2015). Également, des études sur la sclérose en plaques suggèrent que les IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  peuvent moduler le phénotype microglial, influencer le milieu neuroimmunitaire global, réguler la phagocytose et affecter l'intégrité de la BHE (McDonough, Lee, and Weinstein 2017).

**Les chimiokines** sont de petites protéines dont la fonction principale est d'attirer et d'activer les cellules immunocompétentes vers des sites dans lesquels une réponse inflammatoire est requise. Les chimiokines fonctionnent par l'activation de leurs récepteurs couplés aux protéines G et sont divisées en quatre familles, CXC, CC, C et CX<sub>3</sub>C. Les astrocytes et les cellules microgliales sont les principaux producteurs de chimiokines dans le SNC et leurs récepteurs sont observés dans les neurones également. De plus, les chimiokines et leurs récepteurs participent à la réponse immunitaire du SNC en favorisant la migration des lymphocytes à partir des organes lymphoïdes afin d'établir le processus inflammatoire (Ransohoff, Glabinski, and Tani 1996). Des études ont démontré la présence de protéines chimiotactiques de monocytes (MCP-1 ou CCL2) et de récepteurs de chimiokines CCR3 et CCR5 dans la microglie réactive qui entourent les plaques séniles de patients atteints de la MA (Meraz Rios et al. 2013). L'expression différentielle des chimiokines et de leurs récepteurs favorise la communication cellule gliale-neurone pour établir une réponse inflammatoire locale, ce qui pourrait favoriser la phagocytose des protéines A $\beta$  dans les stades précoces de la MA (Meraz Rios et al. 2013).

**Les CSF** sont des glycoprotéines qui induisent la croissance et la prolifération cellulaire. Le CSF multipotentiel (M-CSF) et le CSF granulocyte/macrophage (GM-CSF) sont des mitogènes puissants pour la microglie en induisant de profonds changements morphologiques et phénotypiques (Giulian and Ingeman 1988). Des études ont démontré que le GM-CSF entraînait des modifications moléculaires importantes au sein de la microglie, lui conférant alors une puissante capacité à présenter les antigènes (Re et al. 2002). Il semblerait que le M-CSF et le GM-CSF amplifiaient les réponses inflammatoires au sein du SNC.

## 1.2 La neuro-inflammation et les maladies neurodégénératives

Récemment, plusieurs recherches scientifiques ont permis de faire le lien entre les maladies neurodégénératives et la neuro-inflammation. En effet, plusieurs maladies affectant le SNC, telles que la MA, la MP, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, les tauopathies et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Nagatsu and Sawada 2006; Mrak and Griffin 2005; Christophe and Anita 2002; Block and Hong 2005; Meraz Rios et al. 2013), sont associées à l'inflammation chronique des cellules neuronales. Bien que ces maladies disposent de leurs propres déclencheurs environnementaux de dommages neuronaux ou d'une mutation génétique spécifique, l'accumulation progressive de la mort neuronale et l'augmentation de la sévérité de la maladie au fil du temps constituent un thème unificateur dans les diverses classifications de la maladie neurodégénérative (Block and Hong 2005). Auparavant, l'inflammation était considérée comme une réponse passive aux lésions neuronales. Toutefois, de plus en plus de rapports de recherches indiquent que l'inflammation dans le parenchyme nerveux peut entraîner la mort et des dommages neuronaux importants, ce qui alimenterait alors une boucle de rétroaction positive de mort neuronale. De plus, des études neuropathologiques et neuroradiologiques indiquent que les réponses neuro-inflammatoires peuvent commencer avant la perte significative des populations neuronales dans la progression de ces maladies (Frank-Cannon et al. 2009). Ainsi, alors que les déclencheurs de diverses maladies neurodégénératives sont divers, la neuro-inflammation semble être un mécanisme de base conduisant à la nature progressive de multiples maladies neurodégénératives. Bien qu'il n'y ait aucune preuve pour soutenir le rôle d'une cytokine particulière dans le déclenchement direct de l'une de ces conditions neurodégénératives, la neuro-inflammation et la neurotoxicité entraînées par les cytokines pro-inflammatoires peuvent modifier la progression de la pathogenèse dans un certain nombre de ces maladies. Par exemple, les réactions inflammatoires pourraient servir de déclencheurs révélant des vulnérabilités génétiques préexistantes et ainsi contribuer à la dysfonction et à la mort neuronale (Frank-Cannon et al. 2009). Dans les deux sous-sections suivantes, j'aborderai les découvertes les plus importantes à propos

de l'importance de la neuro-inflammation dans la pathogenèse de deux maladies neurodégénératives les plus étudiées.

### 1.2.1 La maladie d'Alzheimer

La MA représente le trouble neurodégénératif principal chez les personnes âgées (Hirtz et al. 2007). C'est la démence la plus courante représentant à elle seule 70 % des cas (Solfrizzi et al. 2005). La MA est cliniquement caractérisée par une perte progressive des compétences linguistiques, suivie par le déclin de la mémoire et la perte de la localisation spatiale lors d'un stade avancé. Cette maladie neurodégénérative conduit progressivement à une dépendance psychologique et physique complète et finalement à la mort en une ou deux décennies. D'un point de vue pathologique, la perte anormale de neurones et de synapses, dans le cortex cérébral et certaines régions subcorticales, entraîne une atrophie des régions affectées, incluant le lobe temporal, pariétal et une partie du cortex frontal et du gyrus cingulaire (Braak and Braak 1994). Les caractéristiques pathologiques de la maladie sont la présence de plaques A $\beta$  extracellulaires et la présence intracellulaire d'enchevêtrements neurofibrillaires constitués de protéines Tau. D'une part, les plaques A $\beta$  sont le résultat d'un mauvais clivage de la protéine précurseur  $\beta$ -amyloïde (APP- $\beta$ ) par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases engendrant la formation d'un peptide A $\beta$ . Le peptide A $\beta$  va s'agglutiner à d'autres peptides A $\beta$ , conduisant à la formation des plaques amyloïdes. D'autre part, la formation de neurofibrilles est due à l'accumulation anormale des protéines Tau qui se détachent des microtubules et qui s'agrègent entre elles. Ces neurofibrilles finissent par bloquer le transport axonal et affecter le fonctionnement des neurones. Ce n'est que grâce à l'autopsie que la maladie d'Alzheimer peut être diagnostiquée avec certitude, mais on peut également établir un constat clinique fiable grâce aux critères établis en 1984 par l'Institut national des troubles neurologiques et communicatifs et de l'AVC/*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS/ADRDA) (G et al. 1984).

Les causes responsables de l'agrégation des peptides A $\beta$  et de la dégénérescence neurofibrillaire sont encore inconnues, mais des facteurs génétiques et

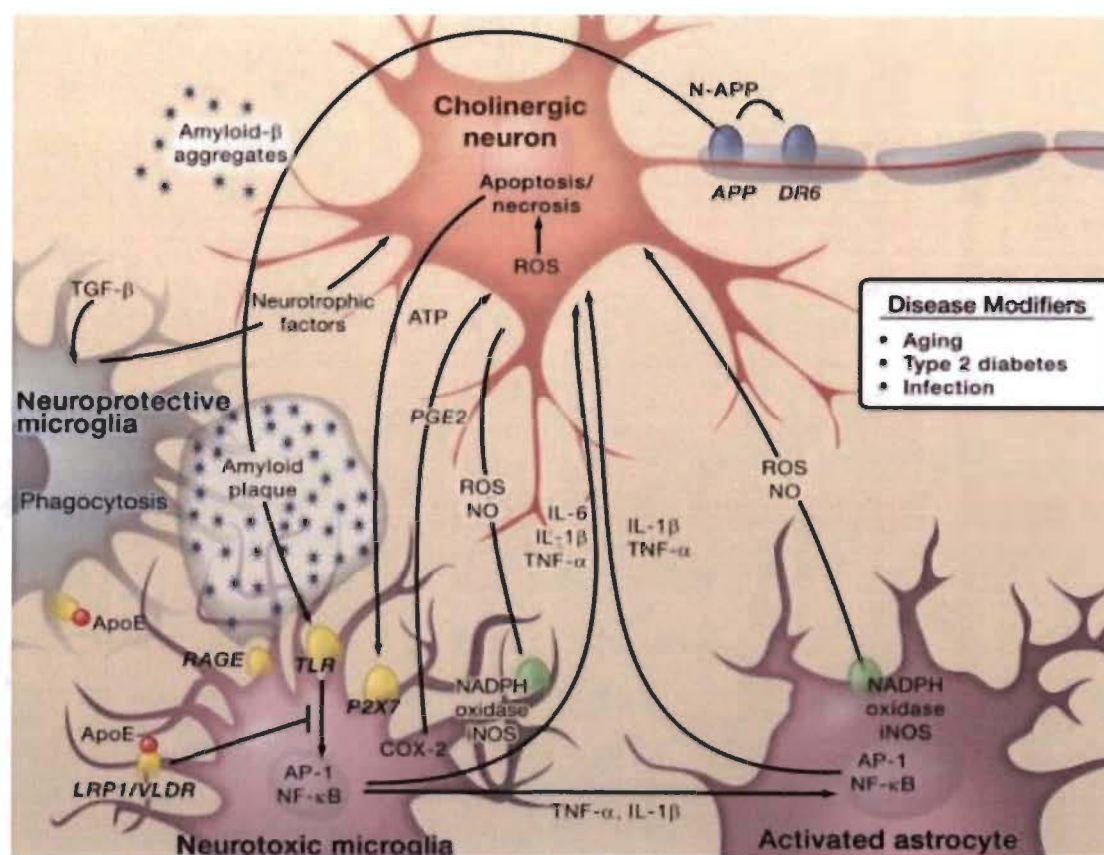


environnementaux contribueraient à leur apparition (Nicolia, Lucarelli, and Fuso 2015). L'incidence des cas familiaux est faible (5-10 %) et est liée à la présence de mutations dans des gènes codants pour trois protéines différentes, soient préséniline-1, préséniline-2 et l'APP- $\beta$  (Sisodia, Kim, and Thinakaran 1999; Duff et al. 1996). Quant aux cas sporadiques, ils représentent 90 à 95 % des cas totaux et l'âge est l'un des principaux facteurs de risque. Bien qu'il existe différentes causes génétiques et environnementales, tous les patients montrent un cadre clinique similaire et développent des lésions cérébrales identiques; des plaques amyloïdes constituées de peptides A $\beta$  et des enchevêtrements neurofibrillaires constitués de protéines Tau.

En 1984, Glenner et ses collaborateurs (GG et al. 1984) ont démontré la présence de cellules microgliales activées autour des plaques A $\beta$  de patients atteints de la MA et suggérèrent que ces cellules pourraient être à l'origine de l'accumulation de peptides A $\beta$ . En 1988, McGeer et ses collaborateurs (PL, S, and EG 1988) ont suggéré qu'un processus immunologique à médiation cytokine gliale pourrait sous-tendre la progression des changements neuropathologiques de type Alzheimer. Ils ont mis en évidence la présence de cellules microgliales activées surexprimant IL-1, une puissante cytokine générant une réponse immunitaire, et d'astrocytes activés surexprimant S100B, une cytokine qui favorise la croissance excessive des neurites, dans la MA et dans le syndrome de Down (Mrak and Griffin 2005). Ces chercheurs ont suggéré que le vieillissement, les mutations et les traumatismes pourraient être des effecteurs de l'activation des cellules gliales et que la surexpression de cytokines telles qu'IL-1 et S100B pourrait engendrer des cascades autopropagatrices qui, avec le temps, entraîneraient des changements neuropathologiques de type Alzheimer.

À ce jour, plusieurs études génétiques et épidémiologiques ont fourni un aperçu des mécanismes inflammatoires impliqués dans la MA (Lee and Suk 2017; Gu et al. 2010) (Figure 1.6). Entre autres, il a été démontré que le peptide A $\beta$  peut activer certaines cellules gliales, notamment les cellules microgliales et astrocytaires via les TLRs et les récepteurs RAGE (Carrero et al. 2012; Meraz Rios et al. 2013). Ces récepteurs activent à leur tour les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1,

qui induisent la production de ROS et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Ces facteurs inflammatoires agissent directement sur les neurones et stimulent également les astrocytes, ce qui amplifie les signaux pro-inflammatoires, induisant des effets neurotoxiques. De plus, les médiateurs pro-inflammatoires générés par les cellules résidentes du SNC induisent la production de molécules d'adhésion et de chimiokines, qui induisent le recrutement de cellules immunitaires périphériques, notamment les macrophages, amplifiant ainsi la réaction inflammatoire (Gate et al. 2010).



**Figure 1.6** Mécanismes inflammatoires impliqués dans la MA (Glass et al. 2010).

### 1.2.2 La maladie de Parkinson

La MP est reconnue comme le deuxième trouble neurodégénératif le plus fréquent après la MA (Hirtz et al. 2007). Les caractéristiques cliniques de la MP comprennent des manifestations motrices et non-motrices. Les principales caractéristiques motrices sont

l'akinésie, la bradykinésie, le tremblement involontaire et rythmique chez les patients au repos et la rigidité extrapyramidale (hypertonie) dans lequel les principaux groupes musculaires deviennent raides. Les symptômes non-moteurs de la maladie, à expression variable, sont notamment l'anosmie, la dysfonction autonome, la dépression, les anomalies cognitives, le dysfonctionnement gastro-intestinal, la psychose et les troubles du sommeil (Whitton 2007).

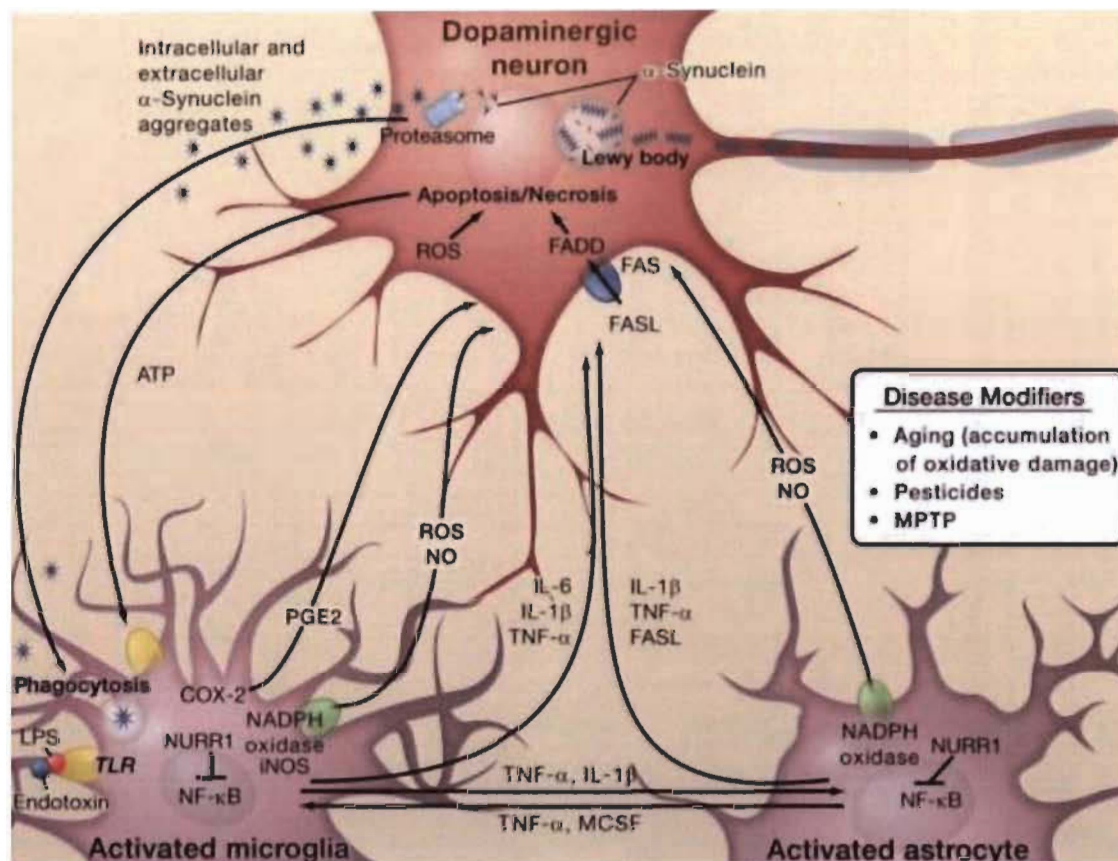
Le diagnostic clinique de la MP est fondé sur l'existence de trois principaux symptômes moteurs (triade parkinsonienne) qui inclut l'akinésie, l'hypertonie et le tremblement au repos (Chaudhuri, Healy, and Schapira 2006). Le diagnostic précis de la MP nécessite l'identification de deux caractéristiques pathologiques (Dauer and Przedborski 2003). D'une part, la MP est décrite comme une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par la perte préférentielle des neurones dopaminergiques dans la substance noire *pars compacta* (SNpc) au niveau du mésencéphale. Les symptômes de la MP ne sont apparents que lorsqu'il y a une perte d'au moins 50 % des neurones dopaminergiques de la SNpc entraînant une réduction de plus de 80 % des niveaux de dopamine dans le striatum (Deumens, Blokland, and Prickaerts 2002). D'autre part, la MP est caractérisée par la présence de corps de Lewy composés d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine dans le mésencéphale (Gwinn-Hardy 2002). Les corps de Lewy sont des inclusions éosinophiles, constituées d'agrégats intracytoplasmiques d' $\alpha$ -synucléine. Ils sont généralement arrondis avec un noyau éosinophile et un halo pâle environnant.

Bien que la MP soit un trouble lié à l'âge touchant environ 3 % des personnes de plus de 65 ans et 4-5 % des personnes de plus de 85 ans, 5-10 % des patients ont moins de 40 ans (Alves et al. 2008). Des études épidémiologiques et des analyses pathologiques démontrent que 95 % des cas de la MP surviennent de manière tardive (CM 2003), tandis que les 5 % restants sont observés à des périodes précoces dans des groupes familiaux spécifiques (Mizuno Y 2001). Bien que la majorité des cas de la MP ne puissent pas être liés à un facteur causal spécifique, la nature génétique de la MP a été liée à des mutations dans plusieurs gènes tels que parkine, l'ubiquitine C-terminal hydrolase-L1 et l' $\alpha$ -synucléine (Gwinn-Hardy 2002).

Outre les facteurs génétiques, plusieurs facteurs environnementaux ont été associés à la dégénérescence neuronale dans la MP. Ceux-ci incluent des toxines, la dysfonction mitochondriale et la mort cellulaire induite par les radicaux libres et le stress oxydatif (Schapira 2004; Ben-Shachar, Zuk, and Glinka 2002; Hoehn MM 1998). L'implication de l'inflammation dans la pathogenèse de la MP a longtemps été remise en question, jusqu'à ce que McGeer et ses collaborateurs (PL, S, and EG 1988), démontrent une augmentation du nombre de cellules microgliales activées et une régulation à la hausse des molécules du CMH chez les patients atteints de la MP. À ce jour, plusieurs études ont suggéré que le stress oxydatif dérivé de l'inflammation et la toxicité dépendante des cytokines peuvent contribuer à la dégénérescence des voies nigro-striées et accélérer la progression de la maladie chez les personnes atteintes de la MP idiopathique. L'existence de processus inflammatoires en cours pouvant contribuer à la progression de la MP est confirmée par la présence de cellules microgliales activées, l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, des dommages oxydatifs aux protéines et au cerveau des patients atteints de la MP (Hirsch and Hunot 2009; McGeer and McGeer 2008) et la plupart des modèles expérimentaux de la MP (Bournival et al. 2012) (Figure 1.7). De plus, quel que soit le nombre d'années de la maladie, les patients atteints de la MP idiopathique présentent une inflammation nettement plus élevée que les témoins en bonne santé dans les régions pons, ganglions de la base, striatum, ainsi que dans les régions corticales frontale et temporale (Gerhard et al. 2006). Cette découverte surprenante suggère que l'activation de la microglie au niveau de la voie nigrostriée pourrait se produire tôt dans la maladie et/ou en parallèle avec la perte de terminaisons dopaminergiques. Prises ensemble, ces études suggèrent fortement que la microglie peut être activée tôt dans le processus pathologique et rester amorcée, ce qui la rend capable de répondre de manière robuste et aberrante aux stimuli subséquents augmentant ainsi le stress oxydatif induit par l'inflammation sur les populations neuronales vulnérables. Également, selon plusieurs chercheurs, dans le cas où la neuro-inflammation ne se produit pas dans les premiers stades du dysfonctionnement des neurones dopaminergiques, la libération d' $\alpha$ -synucléine par les neurones dopaminergiques mourants est susceptible de favoriser une infiltration plus poussée des cellules microgliales activées pour éliminer les débris neuronaux et les d' $\alpha$ -synucléine



(Kim and Joh 2006; Kim Seung and de Vellis 2005). L'activité phagocytaire des cellules microgliales est associée à des sursauts respiratoires et semble renforcer le stress oxydatif auquel s'expose la population restante de neurones dopaminergiques.

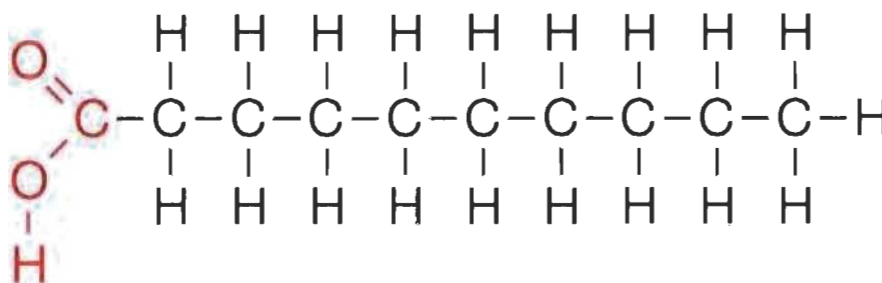


**Figure 1.7** Mécanismes inflammatoires impliqués dans la MP (Glass et al. 2010).

### 1.3 Les acides gras

Les acides gras (AG) appartiennent à la grande famille des lipides et ils sont des chaînes carbonées dont une des deux extrémités est pourvue d'un groupement acide carboxylique (Figure 1.8). Ils sont les constituants majeurs des différentes classes de lipides, soient les triglycérides, les phospholipides, les sphingolipides et minoritairement les esters de cholestérol. Les triglycérides représentent 95 à 98 % des lipides alimentaires ingérés. Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois AG. Ils peuvent être classés brièvement en acides gras saturés (AGS) et acides gras

insaturés (AGI). Les AG se distinguent selon la longueur de leur chaîne d'atomes de carbone (de 4 à 22) et le nombre de doubles liaisons entre les atomes de carbone qu'ils contiennent. À titre d'exemple, l'acide butyrique (C4 :0), le PA (C16 :0) et l'acide arachidique (C20 :0) comportent respectivement une chaîne de 4, 16 et 20 atomes de carbone. La plupart des AG, aussi bien dans l'alimentation que dans l'organisme, comprennent 16 à 18 atomes de carbone.

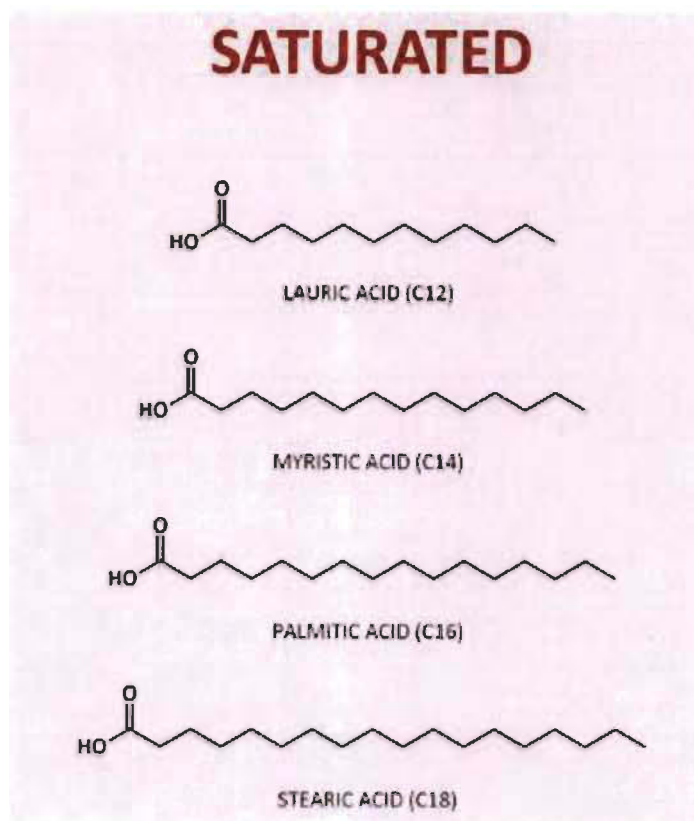


**Figure 1.8** Structure générale d'un acide gras.

Dans les cellules, les AG sont les éléments de structure des membranes biologiques et ils interviennent comme pourvoyeurs d'énergie, ainsi que dans la signalisation cellulaire et la modulation de l'expression de nombreux gènes. Dans l'organisme, les triglycérides, situés principalement dans les tissus adipeux, constituent la forme principale de stockage de l'énergie. Quant aux phospholipides, ils ont davantage un rôle structurant, car ils sont des constituants des membranes cellulaires et en assurent entre autres la fluidité. Finalement, les sphingolipides sont également présents dans les membranes cellulaires, mais ils jouent plutôt un rôle au niveau de la reconnaissance et la signalisation cellulaires. Les AG sont apportés à notre organisme par l'alimentation et/ou par la synthèse *de novo* qui se déroule principalement au niveau hépatique (Kusakabe et al. 2000). Le contenu en AG de notre organisme est un équilibre régulé entre l'apport et/ou la production, et le catabolisme de ces AG par la  $\beta$ -oxydation.

### 1.3.1 Les acides gras saturés

Les AGS sont des AG totalement saturés en hydrogène au niveau de leurs atomes de carbone et leurs liaisons entre les atomes de carbone sont simples. Ils sont constitués d'une chaîne qui varie de 4 à 20 atomes de carbone (Figure 1.9), puis ils sont synthétisés par l'homme en particulier dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation 2011). Leur synthèse est très variée. À titre d'exemple, l'acide palmitique (PA; C16:0) est l'AG le plus intensément synthétisé à partir de l'acétyl-coenzyme A, dans une voie qui va directement de 2 à 16 carbones. Les AGS à plus longues chaînes sont produits en moindre quantité par élongation dans les tissus et les AGS plus courts sont synthétisés par des tissus spécialisés comme la glande mammaire en lactation (Tai, Chirala, and Wakil 1993).



**Figure 1.9** Structure de différents acides gras saturés.

En plus de leur origine endogène, les AGS sont apportés abondamment par l'alimentation. À ce jour, il est bien démontré que les AGS ont des origines,

des métabolismes et des fonctions différentes et qu'on ne doit surtout pas les considérer comme constituant un ensemble homogène (Legrand and Rioux 2010). Les AGS se retrouvent notamment dans les produits animaux (lait, fromage, beurre, viande, lard, etc.), mais également dans les huiles végétales. Dans l'alimentation humaine occidentale (*Western diet*), les produits qui contribuent le plus à l'apport d'AGS sont les viandes et des produits laitiers, ainsi que les produits de panification industrielle et les viennoiseries. Plus précisément, la majorité des huiles végétales alimentaires contiennent une fraction d'AGS relativement faible. À titre d'exemple, les AGS représentent environ seulement 10 % des AG totaux dans l'huile de tournesol et 13 % dans l'huile de maïs et l'huile d'olive. Cependant, par le biais de l'hydrogénation, l'industrie agro-alimentaire transforme une partie des AGI en AGS. Un sous-produit de cette transformation est l'AG *trans* (margarine) produit par isomérisation et provenant des AG *cis*.

Les **AGS à courtes chaînes** sont les principaux produits de la fermentation bactérienne colique des glucides et des acides aminés provenant de substrats exogènes et endogènes. Il a été démontré que l'acide butyrique (C4:0) exerce une action cellulaire sur l'entrée en apoptose de plusieurs types de cellules tumorales, par son effet régulateur sur les déacétylases d'histones (Entin-Meer et al. 2007). Ceci constitue sans doute une explication de son rôle protecteur contre le développement du cancer colorectal (Sengupta, Muir Jane, and Gibson Peter 2006).

Pour leur part, les **AGS à chaînes moyennes** (C6:0 acide caproïque, C8:0 acide caprylique, C10:0 acide caprique), contenu surtout dans l'huile de noix de coco, sont particulièrement intéressants, car ils sont de rapides pourvoyeurs d'énergie (Bach and Babayan 1982). En effet, ils sont captés par les entérocytes de l'intestin, puis acheminés dans la veine porte avec passage obligé dans le foie où ils peuvent être directement oxydés et servir comme source d'énergie. Cette caractéristique physiologique principale permet de les distinguer des AGS à longues chaînes qui, après leur intégration dans les chylomicrons, empruntent d'abord le circuit lymphatique pour atteindre ensuite la circulation générale ce qui leur donne la possibilité de se déposer dans le tissu adipeux et une moindre possibilité d'être catabolisé dans le foie (Petit et al. 2007). De plus, les



AGS à chaînes moyennes semblent avoir un rôle neutre, voire plutôt protecteur, contre l'adiposité chez l'homme (Nosaka et al. 2003). Enfin, il est rapporté également qu'ils ne sont pas associés au risque de maladies cardiovasculaires, contrairement au AGS à longues chaînes (Hu et al. 1999).

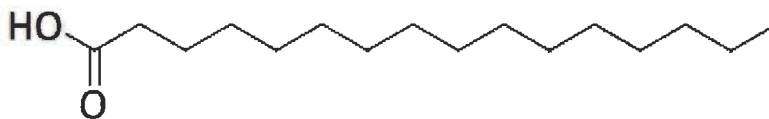
Finalement, les **AGS à longues chaînes** ( $C > 10$ ) sont les plus abondants dans l'alimentation. Ils comprennent les acides laurique ( $C12:0$ ), myristique ( $C14:0$ ), palmitique ( $C16:0$ ) et stéarique ( $C18:0$ ). Les AGS à longues chaînes sont en partie convertis par désaturation en AG mono-insaturés (AGMI). Cependant, l'efficacité du processus est significativement différente et croissante avec la longueur de la chaîne (Legrand et al. 2002). Le PA est le plus activement synthétisé par l'homme, tout en étant le AGS le plus abondant dans l'alimentation. Son accumulation est maximale dans tous les tissus. Par ailleurs, l'acide myristique est davantage catabolisé ( $\beta$ -oxydé) que le PA et sa demi-vie est plus courte que ce dernier (Rioux, Lemarchal, and Legrand 2000). Enfin, notons que certains métabolites issus du métabolisme des AGS à très longues chaînes ( $C > 18$ ), par exemple la sphingomyéline, occupent une place importante dans la structure des membranes nerveuses, notamment dans la myéline (Bourre, Daudu, and Baumann 1976).

#### ***1.3.1.1 L'huile de palme et l'acide palmitique***

Avec plus de 50 millions de tonnes produites chaque année, l'huile de palme est l'huile végétale la plus consommée au monde représentant 35 % de la consommation mondiale en 2017 (Greenpeace 2017). L'huile est extraite par pression à chaud du mésocarpe des fruits d'*Elaeis guineensis* (palmier à huile), un arbre originaire d'Afrique tropicale dont est aussi tirée l'huile de palmiste, plutôt extraite du noyau de ses fruits. L'huile est l'ingrédient traditionnel des cuisines d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie, puis elle est actuellement massivement utilisée dans les pays non producteurs pour la fabrication d'aliments transformés, en remplacement des graisses animales (beurre) et des huiles végétales *trans*. L'huile de palme est notamment prisée par l'industrie agro-alimentaire pour les qualités suivantes; semi-solide à température ambiante, goût neutre,

résistante à la chaleur et résistante à l'oxydation. Elle est donc un adjuvant idéal pour les produits transformés.

Comparativement à la plupart des autres huiles végétales telles que les huiles d'olive et de tournesol, l'huile de palme non raffinée contient une grande quantité d'AGS (40-50 % des AG total), la majorité étant sous forme de PA (Fattore and Fanelli 2013). Le PA, également appelé acide cétylique ou acide hexadécanoïque, est composé de 16 atomes de carbone (C16 :0) et il est classé parmi les AGS à longues chaînes (Figure 1.10). Chez l'homme, PA est l'AGS le plus abondant dans le plasma et, avec le stéarate, il constitue 90 % des AGS circulantes (Weigert et al. 2004).



**Figure 1.10** Structure de PA (C16 :0).

Depuis le début du XXI<sup>e</sup> siècle, il existe des controverses au sujet de l'huile de palme et de son impact sur la santé humaine, ainsi que de l'impact de sa production sur l'environnement lié à la culture des palmiers à huile. D'une part, certains critiquent sa haute teneur en AGS. De fait, une méta-analyse reprenant toutes les études scientifiques publiées sur le sujet conclut que l'huile de palme a un impact négatif sur le taux de cholestérol semblable à celui des graisses animales, pas beaucoup plus faible que celui des graisses *trans*, et bien plus fort que celui des huiles végétales riches en AGI (olive, arachide, etc.) (Sun et al. 2015). D'autre part, certaines organisations non gouvernementales dénoncent, quant à elles, le développement des plantations de palmiers à huile, car il entraîne une importante déforestation en Malaisie, Indonésie et Papouasie-Nouvelle-Guinée, et constitue une grave menace pour diverses espèces animales vivant dans ces forêts et déjà en danger d'extinction (orang-outan, gibbon, tigre, etc.).

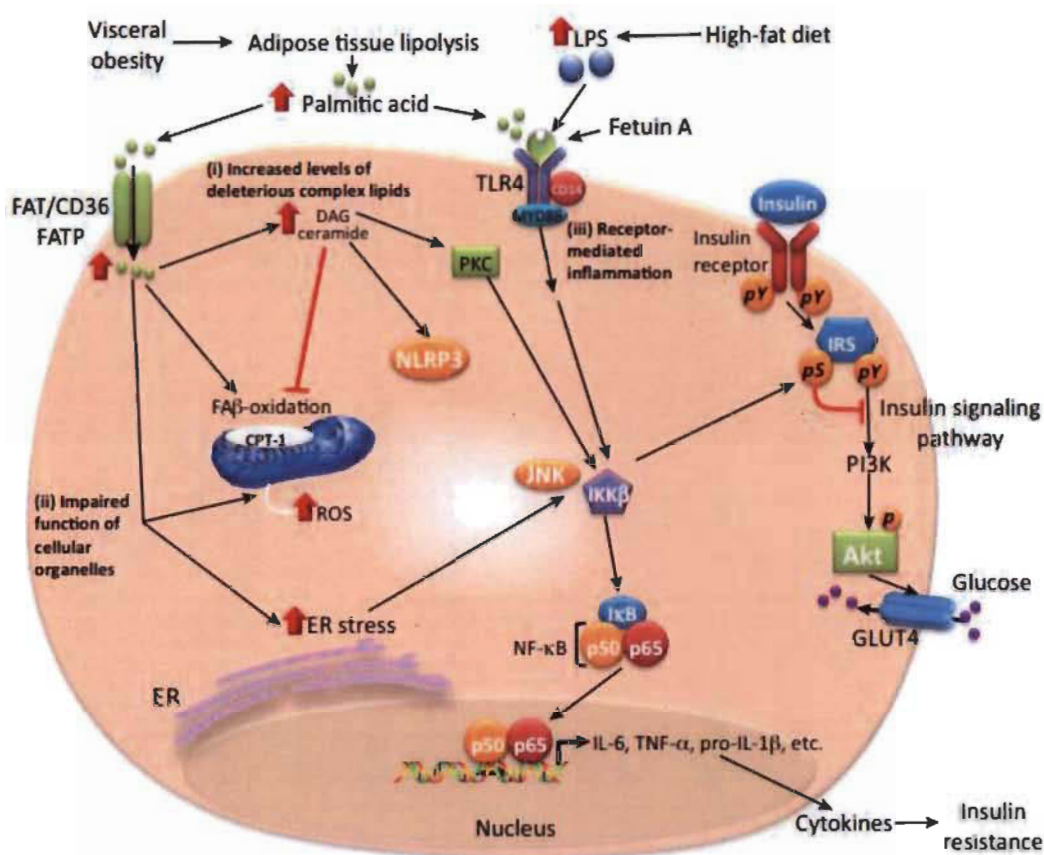
Ainsi, face aux conséquences sur la santé humaine liées à la consommation de l'huile de palme dans les produits agroalimentaires industriels, le PA est une molécule prometteuse pour étudier le potentiel rôle pro-inflammatoire des AGS à longues chaînes sur l'homéostasie du SNC.

### ***1.3.1.2 Rôle inflammatoire de l'acide palmitique au niveau des tissus périphériques***

Au cours des dernières décennies, la recherche s'est concentrée sur l'examen des impacts de la consommation à long terme de régimes riches en graisses typiques des pays développés occidentaux, mieux connus comme la *Western diet*. En effet, ce type de diète est l'une des principales causes de l'obésité, qui est de plus en plus répandue dans ces pays (Astrup et al. 2007). C'est un problème de santé publique important, car l'obésité est étroitement associée à un risque accru d'une myriade de maladies, notamment le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires, les troubles gastro-intestinaux et respiratoires, les accidents vasculaires cérébraux et de nombreux types de cancer (ASPC 2016).

Plusieurs études récentes ont permis d'apporter un bon nombre d'informations plus précises, notamment en ce qui a trait aux taux plasmatiques élevés d'AG libres dans le plasma des personnes obèses et leur implication dans la modulation du système immunitaire (De Pablo Manuel and De Cienfuegos Gerardo 2000; Riera-Borrull et al. 2017). En effet, la consommation chronique et soutenue d'AGS, entraîne une inflammation du tissu adipeux blanc (Figure 1.11), du foie et du muscle squelettique impliqués dans la pathogenèse des maladies métaboliques incluant le diabète de type II (Bergman and Ader 2000) et l'athérosclérose (Singh et al. 2002). À titre d'exemple, l'avènement d'une réponse immunitaire chronique chez des patients diabétiques est supporté, entre autres, par la présence de concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans leur circulation sanguine (Pickup et al. 2000; Kern et al. 2001).

Dans le même ordre d'idées, des études récentes indiquent un effet pro-inflammatoire spécifique des AGS, notamment PA, sur plusieurs types cellulaires. Notamment, selon Laine et ses collaborateurs (Laine et al. 2007), dans les monocytes humains, des cellules du système immunitaire, PA active la signalisation inflammatoire et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ce sont les céramides, des métabolites spécifiques des AGS à longues chaînes (Chavez et al. 2003), via l'activation des kinases p38 et JNK et du facteur de transcription c-Jun, qui activent les voies de signalisation médiatrices de la sécrétion des cytokines (Westwick et al. 1995; MacKichan and DeFranco 1999). Également, il a été démontré que PA induit l'expression d'IL-6 dans les myoblastes humains (Weigert et al. 2004), les cellules endothéliales (Staiger et al. 2004) et les adipocytes (Ajuwon and Spurlock 2005). Les gènes des cytokines pro-inflammatoires sont régulés au niveau transcriptionnel par plusieurs facteurs de transcription, dont AP-1, NF- $\kappa$ B et CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*) (Hwang, Kim, and Lee 2016; Guha and Mackman 2001). L'activité des facteurs de transcription AP-1 et CREB est à son tour régulée par plusieurs kinases telles que les kinases JNK et p38, qui activent les facteurs de transcription par phosphorylation (Weston and Davis 2002; Tan et al. 1996; Rolli et al. 1999) (Figure 1.11). Également, il a été rapporté que les AGS à longue chaîne favorisent l'inflammation en activant le TLR4 (Lee et al. 2001). Cela a été encore confirmé dans des modèles de rongeurs obèses *in vivo*, qu'un régime riche en AGS à longue chaîne engendre l'activation du TLR4 dans les macrophages et le tissu adipeux (Shi et al. 2006). Enfin, des études *in vitro* soutiennent également la possibilité que les AGS à longue chaîne soient capables d'activer TLR2 et TLR4 (Huang et al. 2012).



**Figure 1.11** Mécanisme d'action de PA dans les adipocytes (Palomer et al. 2018).

### 1.3.1.3 Rôle inflammatoire des acides gras saturés au niveau du tissu nerveux

Récemment, plusieurs études se sont intéressées aux effets néfastes d'une diète riche en AGS sur la physiologie du SNC (Fraga et al. 2017; Morris et al. 2006; Solfrizzi et al. 2005). En effet, des études ont démontré que la consommation constante d'AGS augmente la quantité d'AG dans le cerveau et est à même d'induire la neuro-inflammation (Cai 2013; Karmi et al. 2010; Valdearcos et al. 2014). En effet, l'homéostasie des AG du cerveau peut dépendre de ses niveaux en périphérie puisque les AG libres peuvent traverser la BHE (Smith and Nagura 2001). Par conséquent, il est concevable que les régimes riches en AGS puissent augmenter l'absorption cérébrale des AG libres du plasma à travers la BHE et affecter les fonctions cérébrales (Wang et al. 2014). Enfin, il est déjà bien établi que les concentrations plasmatiques d'AG

augmentent significativement en association étroite avec l'obésité et le syndrome métabolique (Opie and Walfish 1963; Reaven et al. 1988).

Les AGS sont connus pour influencer en partie les niveaux d'obésité, puisqu'ils causent une dérégulation et une dégénérescence des noyaux hypothalamiques contrôlant les comportements de faim et de satiété (Cai 2013; Valdearcos et al. 2014). De plus, les AGS ont aussi été associées au développement de troubles cognitifs présents dans la MA et la MP par leur participation aux réponses immunitaires inflammatoires périphériques (Anstey et al. 2011; Businaro et al. 2012; Xu et al. 2011). En effet, le système immunitaire périphérique influence le SNC par la libération de cytokines ciblant différents districts cérébraux. Elles peuvent provenir de cellules immunitaires périphériques et atteindre le SNC en traversant la BHE ou peuvent être directement produites dans le SNC par les neurones et les cellules gliales (Watkins, Maier, and Goehler 1995).

Le cerveau est très sensible aux médiateurs inflammatoires et de nombreuses données indiquent que les cytokines peuvent avoir des effets indésirables sur la cognition et l'homéostasie neuronale (Wilson Craig, Finch Caleb, and Cohen Harvey 2008). Des taux relativement élevés de liaison aux cytokines ont été démontrés chez la souris par immunohistochimie dans certaines zones associées à l'apprentissage et à la mémoire, notamment les régions du cortex et de l'hippocampe (Parnet et al. 2002). Il est bien établi que des cytokines comme  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  et  $\text{IL-6}$  peuvent perturber les mécanismes neurophysiologiques impliqués dans la cognition et la mémoire chez le rat (Jankowsky and Patterson 1999; Shabab et al. 2017). Ainsi, les élévations concertées de ces cytokines dans le cerveau pourraient jouer un rôle majeur dans le développement de complications neurologiques indésirables de l'obésité et de la consommation d'une diète riche AGS.

Des recherches prospectives sur l'homme ont permis l'étude de l'effet de l'apport en lipides alimentaires, tant au niveau de la quantité que de la composition, sur le développement de la MA (Morris et al. 2003; Kalmijn et al. 2004; Luchsinger et al.

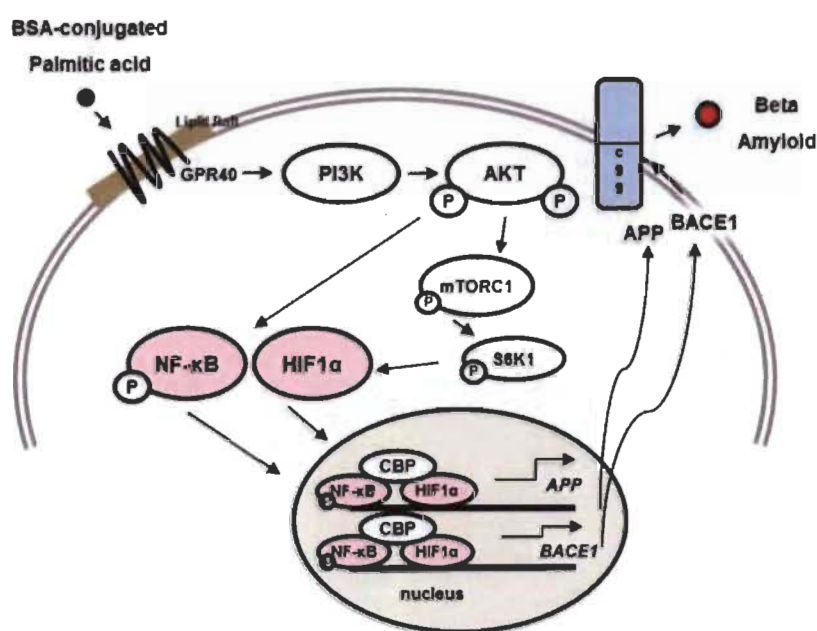


2002; Engelhart et al. 2002). Ces études suggèrent qu'un régime riche en AGS peut être lié au développement de maladies neurodégénératives telles que la MA. D'autres études expérimentales *in vivo* chez l'animal ont confirmé la vulnérabilité neurologique à l'obésité et au régime riche en AGS et ont montré que le dysfonctionnement métabolique induit par l'alimentation entraînait une inflammation cérébrale accrue, une gliose réactive et une vulnérabilité aux blessures (Bruce-Keller, Keller, and Morrison 2009; Pistell et al. 2010). De plus, Valdearcos et ses collaborateurs (Valdearcos et al. 2014) ont illustré dans un modèle murin *in vivo* que le gavage intragastrique avec 200 µl de graisse de lait clarifié (> 60 % d'AGS à longue chaîne, dont 35 % de PA), pendant seulement 3 à 10 jours, induit une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  spécifiquement par la microglie au niveau de l'hypothalamus. En revanche, le gavage d'un volume isocalorique d'huile d'olive (> 80 % d'AGI, principalement de l'acide oléique (OA)) n'a pas induit l'activation de la microglie. Également, ils ont démontré que le gavage avec de l'huile de coco (> 70 % d'AGS, principalement composée d'AGS à courtes chaînes, en particulier l'acide laurique), engendrait une réaction mitoyenne entre celle de l'huile d'olive et celle du lait, indiquant que certains des effets pro-inflammatoires des AGS alimentaires pourraient être fonction de la longueur de leur chaîne.

#### ***1.3.1.4 Rôle inflammatoire de l'acide palmitique dans les cellules nerveuses***

Puisque l'huile de palme est l'huile végétale la plus consommée au monde et elle est utilisée abondamment par l'industrie agroalimentaire, il est primordial de comprendre le potentiel d'action de PA au sein des cellules du SNC pour appréhender les impacts de sa consommation. Notamment, des études *in vitro* ont permis de démontrer le rôle de PA dans l'induction d'une réaction inflammatoire au sein des astrocytes et des neurones. Il a été démontré que PA active le TLR4 et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans des astrocytes cultivés, puis qu'il module le traitement amyloïde dans les neurones et les astrocytes responsables de la pathogenèse de la MA (Gupta et al. 2012; Patil and Chan 2005; Kim et al. 2017). D'autres études effectuées sur des cellules souches neurales illustrent que PA peut affecter la différenciation et la prolifération de ces cellules et qu'il peut induire un stress oxydatif et

l'apoptose (Wang et al. 2014). Enfin, d'autres recherches ont illustré que dans les neuroblastes, PA lié à l'albumine active le GPR40, augmente l'expression d'APP et de BACE1 via les voies NF- $\kappa$ B et HIF-1 $\alpha$ , puis induit la production de A $\beta$  (Kim et al. 2017) (Figure 1.12). Finalement, Sergi et ses collaborateurs (Sergi et al. 2017) ont illustré que le PA induit la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans les neurones hypothalamiques N42 *in vitro* et de cultures primaires de rats *in vivo*. Dans les cellules *in vitro*, le pic d'expression des cytokines était à 6 h et PA n'induisait pas l'apoptose des neurones à ce moment.

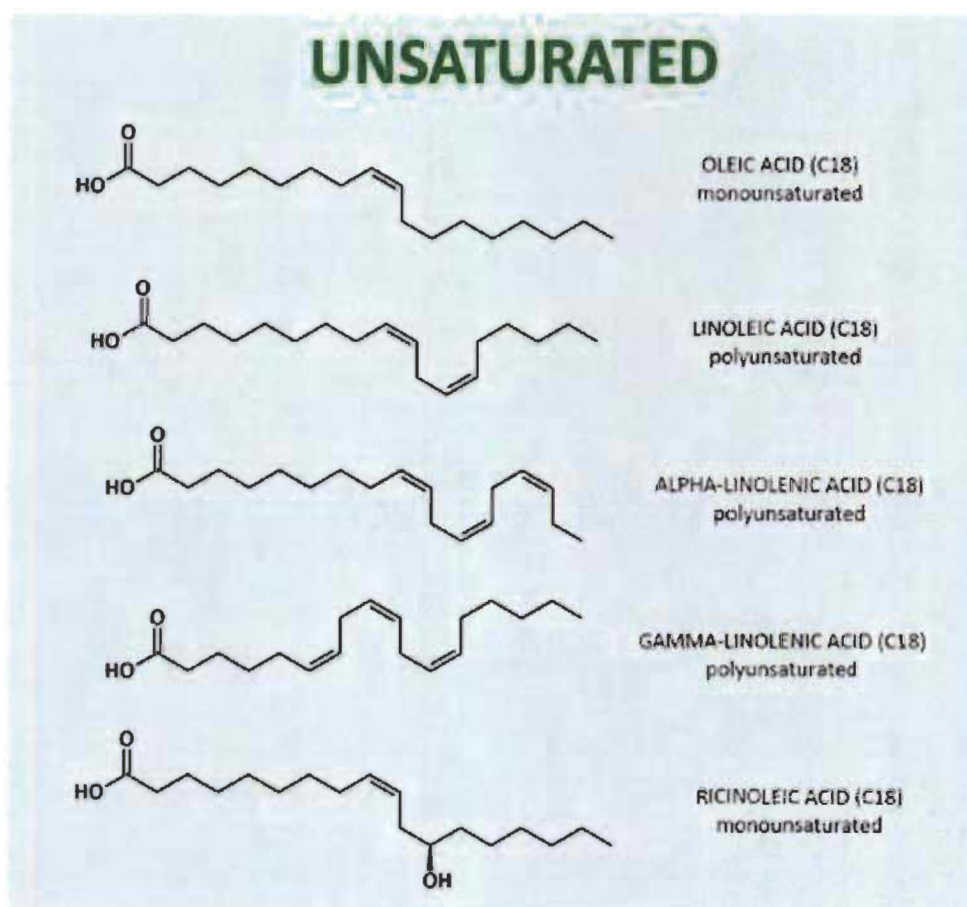


**Figure 1.12** Mécanisme des actions non-génomiques de PA lié à l'albumine dans des neuroblastes *in vitro* (Kim et al. 2017).

### 1.3.2 Les acides gras insaturés

Les AGI sont des AG qui comporte une ou plusieurs liaisons carbone-carbone (Figure 1.13). Les AGI comprennent les AGMI et les AG polyinsaturées (AGPI). Les AGMI incluent les oméga-9 et le principal représentant est l'acide oléique (C18:1; OA), caractéristique de la diète méditerranéenne (MedDiet) riche en huile d'olive. Les principaux AGPI sont les oméga-3 et les oméga-6 et leurs précurseurs sont les

acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique respectivement. Les oméga-3 et les oméga-6 sont essentiels pour l'homme, car ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo*. L'acide linoléique produit principalement l'acide arachidonique, alors que l'acide  $\alpha$ -linoléique donne lieu principalement à l'acide eicosapentaénoïque et à l'acide docosahexaénoïque. Les principales sources d'AGPI oméga-3 sont les poissons gras (saumon, thon et maquereau), tandis que les sources principales d'oméga-6 sont les huiles végétales. À titre d'exemple, l'huile d'olive contient 70-80 % d'AGMI (particulièrement OA) et 8-10 % d'AGPI (6-7 % d'acide linoléique et 1-2 % d'acide  $\alpha$ -linoléique).



**Figure 1.13** Structure de différents acides gras insaturés.

Le rôle des AGPI a largement été étudié dans les dernières décennies pour leur implication sur la santé humaine. En général, les métabolites issus des oméga-6 sont reconnus pour leurs effets pro-inflammatoires, pro-thrombotiques et hypertenseurs, tandis que ceux issus des oméga-3 ont globalement un effet inverse (Figure 1.14).

Le rapport alimentaire optimal entre ces deux classes d'AG est généralement estimé entre 1 et 4 fois plus d'oméga-6 que d'oméga-3. Cependant, l'alimentation humaine occidentale apporte en moyenne 16 fois plus d'oméga-6 que d'oméga-3, avec des valeurs pouvant dépasser 30 fois dans certains régimes alimentaires particulièrement déséquilibrés. Un excès trop prononcé d'oméga-6 par rapport aux oméga-3 tend à favoriser le développement de diverses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, des cancers, puis diverses maladies inflammatoires et auto-immunes (Jouvène 2016).

Toutefois, les études scientifiques se sont moindrement axées sur les AGMI, notamment les oméga-9. En effet, les AGMI étaient autrefois généralement considérés comme étant des AG neutres et l'huile d'olive a été classiquement utilisée comme traitement placebo dans des études qui étudiaient les effets des huiles de poisson sur la fonction immunitaire (Carrillo, Cavia, and Alonso-Torre 2012). Néanmoins, aujourd'hui, il y a des preuves mettant en évidence que les huiles riches en AGMI ont des effets qui sont similaires aux effets des huiles de poisson, sur les modèles animaux. Plusieurs études épidémiologiques telles que l'étude dite des « Sept Pays », entamée en 1958, a exploré sur plus de 15 500 hommes âgés de 40 à 59 ans, pendant quinze ans, la relation entre certains facteurs de risque et la mortalité coronaire dans sept pays : États-Unis, Finlande, Grèce, Italie, Japon, Pays-Bas, Yougoslavie. Ces études épidémiologiques ont montré que dans les pays méditerranéens (Grèce, Italie, Yougoslavie), il y avait une plus faible incidence de mortalité et de maladies cardiovasculaires que dans les pays nordiques (États-Unis, Finlande), réduisant le risque de développer le syndrome métabolique, le diabète de type II, certaines maladies neurodégénératives et cancers (Serra-Majem, Roman, and Estruch 2008; Keys 1980). Cette diète (MedDiet) est caractéristique d'une consommation abondante d'aliments riches en oméga-9, notamment l'huile d'olive riche en OA (Casas, Sacanella, and Estruch 2016).

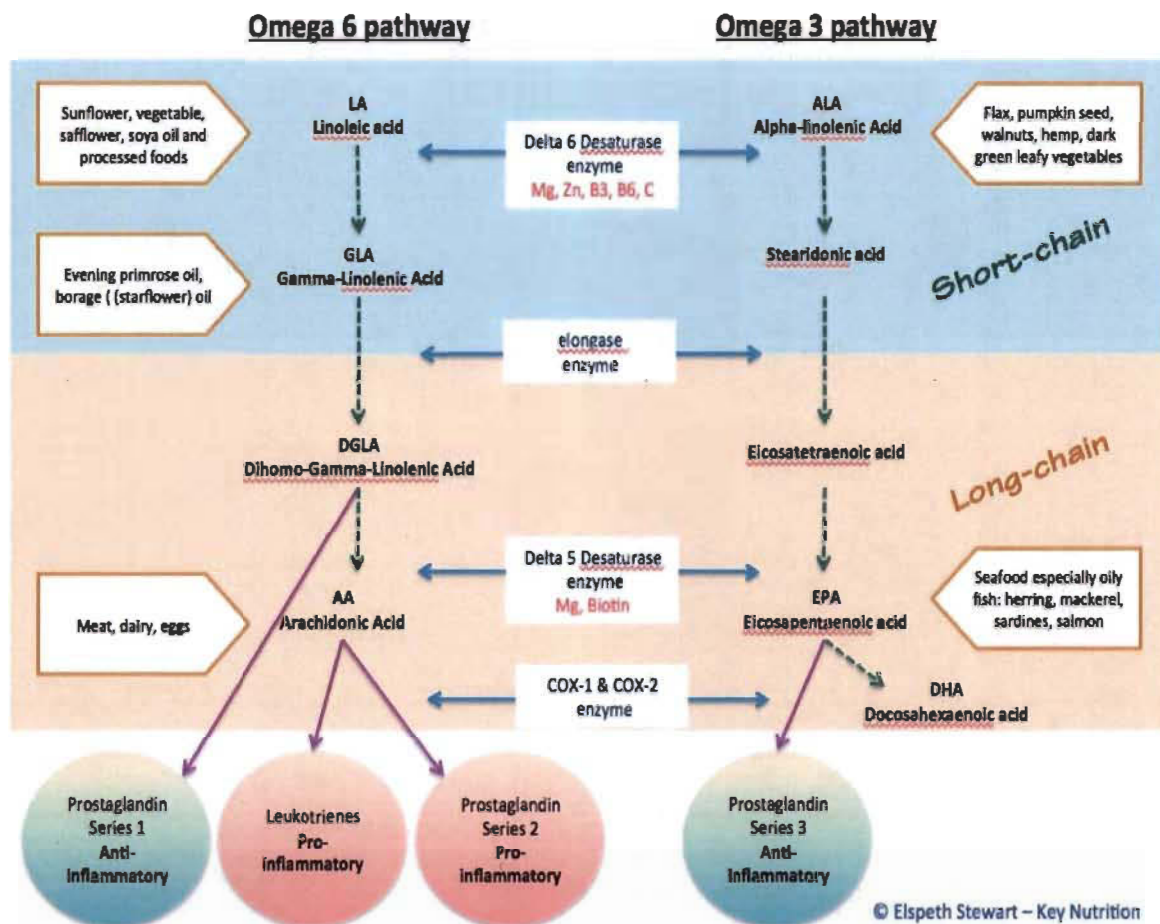


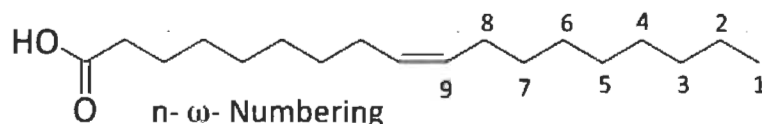
Figure 1.14 Métabolisme des oméga-6 et oméga-3 (Tirée de <http://key-nutrition.com>).

### 1.3.2.1 L'acide oléique (OA)

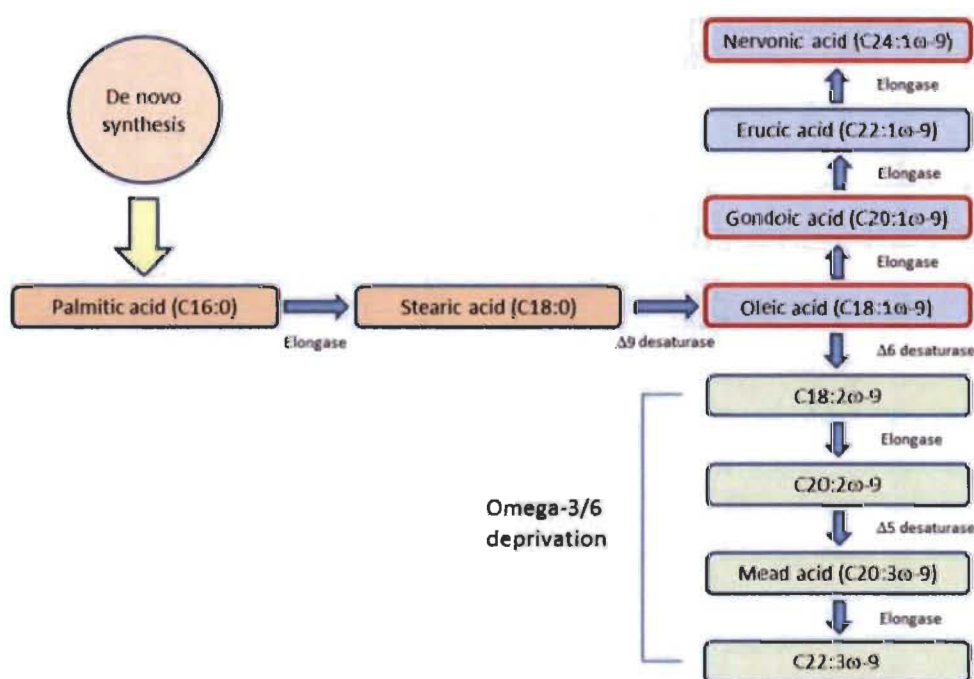
L'OA (C18: 1, Figure 1.15) et le PA sont les AG alimentaires et plasmatiques les plus abondants et représentent 31 % et 27 % respectivement des AG plasmatiques totaux chez l'humain (Palomer et al. 2018). Comme les AGS, et à la différence des AGPI essentiels, les AGMI proviennent, d'une part de la synthèse endogène chez l'homme, et d'autre part de l'alimentation. La synthèse endogène des AGMI est réalisée par la  $\Delta$ -9-désaturase qui introduit une double liaison sur le PA et sur l'acide stéarique, conduisant à l'OA (oméga-9) (Figure 1.16). L'OA représente la quasi-totalité des AGMI en nutrition humaine et il est parmi les AG les plus abondants dans la MedDiet. La concentration de l'OA représente 55 à 83 % des AG totaux constituant l'huile



d'olive, tandis que celle des autres acides (linoléique, palmitique ou stéarique) varie entre 3 % et 21 % (Rosa, Ramon, and Emilio 2018). De manière plus évocatrice, 100 g d'huile d'olive contient en moyenne 74 g d'OA (Salas-Salvadó et al. 2014). D'autres huiles d'origine végétale contiennent également de fortes concentrations en OA, comme l'huile d'avocat, l'huile de colza, l'huile d'amande ou l'huile d'arachide (Solfrizzi et al. 2005).



**Figure 1.15** Structure de l'OA (C18 :1 n-9).



**Figure 1.16** Métabolisme des oméga-9 chez l'homme (Delgado et al. 2017).

L'OA est utilisé comme source d'énergie cellulaire, il est également le constituant de tous les types de lipides, en particulier des triglycérides de réserve (tissu adipeux) qu'il maintient à l'état fluide à la température corporelle, grâce à sa conformation mono-insaturée. L'OA est aussi le substrat préférentiel de l'enzyme estérifiant le cholestérol.

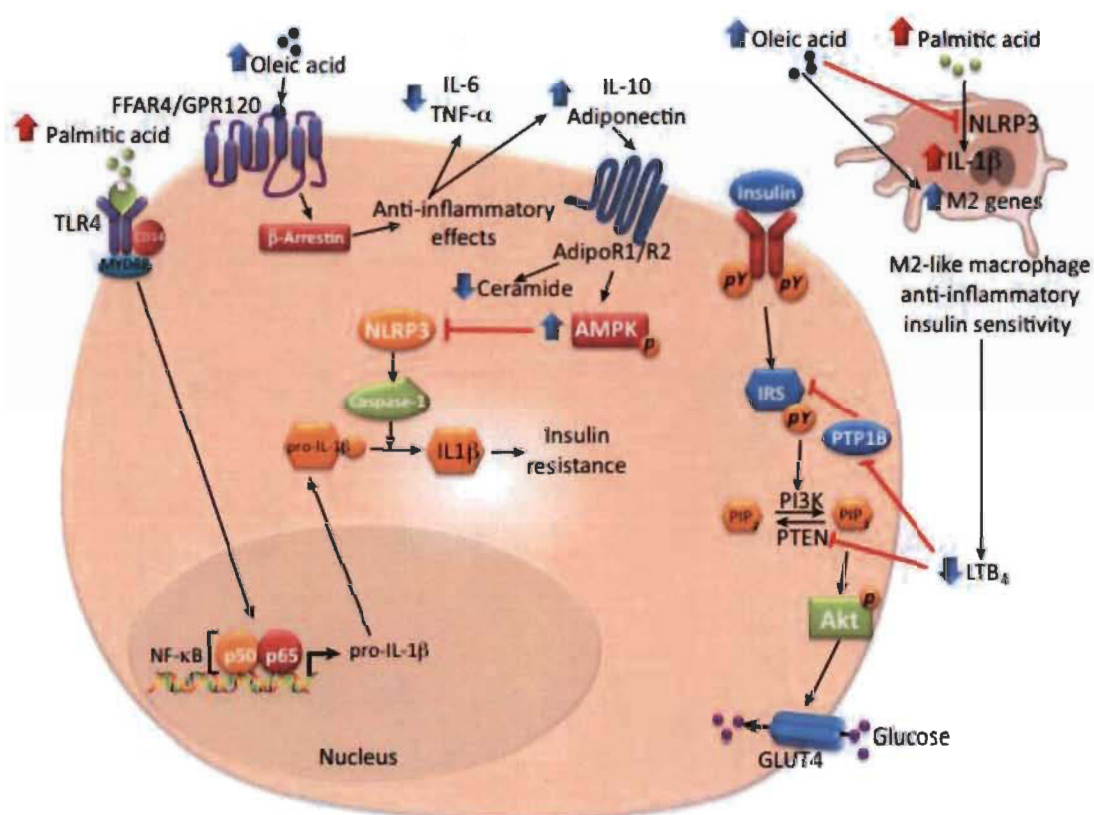


Les esters de cholestérol ainsi formés représentent la forme de transport du cholestérol au sein des lipoprotéines. De plus, au niveau hépatique, l'OA endogène favorise la sécrétion des triglycérides sous forme de VLDL (*very low density lipoprotein*) (Legrand et al. 1997). Il est à noter que les dérivés à très longues chaînes de l'OA (Figure 1.16), notamment à 24 atomes de carbone, sont importants dans les structures cérébrales, en particulier dans la myéline (Bourre, Daudu, and Baumann 1976). Comme pour les AGS et AGPI, l'OA est un constituant majeur des phospholipides membranaires et participe à la modulation de l'activité des enzymes, des transporteurs et des récepteurs (Delgado et al. 2017). Enfin, on peut affirmer que les AGMI alimentaires pris dans leur ensemble interviennent dans le maintien de l'intégrité structurelle des membranes neuronales, déterminent la fluidité des membranes synaptosomales et régulent ainsi la transmission neuronale (Solfrizzi et al. 2005; Panza et al. 2007).

#### ***1.3.2.2 Le rôle anti-inflammatoire de l'acide oléique***

La grande majorité des études *in vivo* qui se sont intéressées à l'OA sont plusieurs méta-analyses et études épidémiologiques qui ont analysé la MedDiet et ont démontré les effets bénéfiques de l'adhésion à ce régime et notamment de la consommation d'OA. En effet, plusieurs recherches épidémiologiques ont démontré que l'adhésion à la MedDiet réduit les risques de maladies cardiovasculaires, de cancer et les démences telles la MA et la MP (Petersson and Philippou 2016; Romagnolo and Selmin 2017). Ce régime entraîne également une régulation négative des bio-marqueurs inflammatoires circulants (Urpi-Sarda et al. 2012) et du stress oxydatif (Gonçalves-de-Albuquerque et al. 2016). Enfin, la production de cytokines pro-inflammatoires chez l'homme peut être diminuée par les AGMI contenus dans l'huile d'olive (Capurso et al. 2004). De plus, il a été démontré que les AGMI influencent les mécanismes inflammatoires tissulaires, diminuant la réactivité tissulaire aux cytokines inflammatoires, réduisant l'expression des molécules d'adhérence cellulaires vasculaires (VCAM-1) et intercellulaires (ICAM-1) des cellules mononucléées et endothéliales respectivement.

Chez les souris transgéniques *in vivo*, il a été démontré qu'une diète pauvre en AGS et riche en OA réduit la sécrétion du peptide A $\beta$  et la neuropathologie de type MA (Amtul et al. 2010). De plus, chez les rats *in vivo*, la consommation d'un régime riche en AGS induit l'expression de la protéine de choc thermique 72 (HSP72) (Thaler et al. 2012), une protéine chaperon impliquée dans la réponse au stress neuronal (Sharp, Massa, and Swanson 1999). En revanche, le gavage avec de l'huile d'olive riche en OA n'induit pas l'expression neuronale de HSP72.



**Figure 1.17** Métabolisme d'OA dans les adipocytes et les macrophages (Palomer et al. 2018).

Finalement, quelques études *in vitro* et axées uniquement sur OA démontrent ses effets bénéfiques, notamment anti-inflammatoire (Figure 1.17). Entre autres, des études sur des monocytes et des macrophages *in vitro* illustrent que les AGS, mais pas les AGMI, induisent l'activation de NF- $\kappa$ B, puis l'expression de COX-2 et d'autres marqueurs pro-inflammatoires (Lee et al. 2001). De plus, lorsque les AGS et AGMI sont

administrés simultanément, les AGMI diminuent la réaction inflammatoire induite par les AGS. Enfin, au niveau des astrocytes, l'OA n'augmente pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF- $\alpha$  et IL-6, contrairement à PA (Gupta et al. 2012).

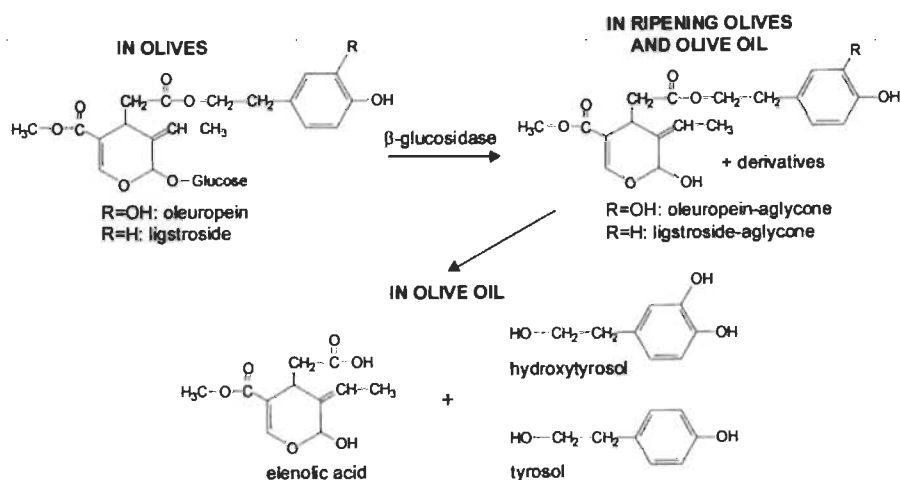
#### 1.4 L'oleuropéine (OLE)

Les effets bénéfiques de la MedDiet ne se limitent pas uniquement aux propriétés d'OA abondant dans l'huile d'olive vierge extraite à froid du cultivar *Olea europaea*. En effet, l'huile d'olive se distingue nettement des autres types d'huiles par le fait que la méthode d'extraction est faite par processus de nature exclusivement mécanique (Lopez-Miranda et al. 2007). Ainsi, l'huile d'olive ne conserve pas moins de 230 composés chimiques suite à son extraction. Ces molécules présentes en petites quantités constituent environ 2 % du poids de l'huile et incluent des alcools aliphatiques et triterpéniques, des stérols, des vitamines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$  et tocophérols), des phytostérols, des pigments et des composés volatils, des hydrocarbures (squalène) et des composés volatils (Ghanbari et al. 2012; Rosa, Ramon, and Emilio 2018).

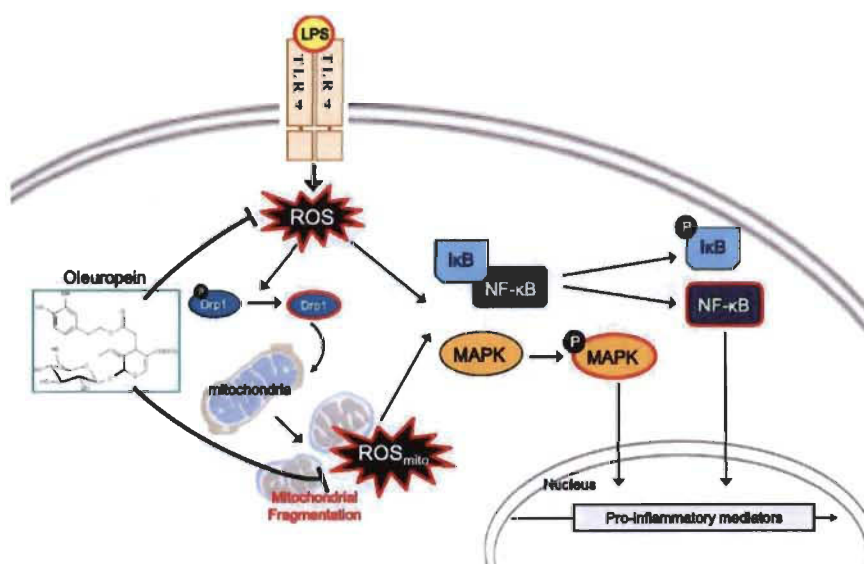
L'OLE est le principal métabolite secondaire dans l'huile d'olive incluant ses dérivés, soient le tyrosol et l'hydroxytyrosol (Figure 1.18). C'est un composé phénolique de la famille des sécoiridoides et il est présent dans tout le spectre des produits dérivés d'*Olea europaea*. Suite à la consommation d'huile d'olive, l'absorption est estimée entre 55 à 66 % de la dose ingérée. L'absorption chez l'homme est confirmée par l'excrétion du tyrosol et de l'hydroxytyrosol dans l'urine. Enfin, l'OLE peut traverser la BHE, notamment il a été détecté dans le parenchyme nerveux de rat après l'administration orale (Angeloni et al. 2017).

Selon plusieurs études, la consommation de l'OLE aurait de nombreux avantages pharmacologiques. Ceux-ci comprennent des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-athérogènes, hypoglycémiantes, anti-tumorales et anti-virales (Rigacci and Stefani 2016). Il a été démontré par plusieurs recherches que l'OLE peut exercer un effet neuroprotecteur et a été associé à la probabilité de prévenir la MA et la

MP, tout en diminuant leurs effets indésirables connexes (Angeloni et al. 2017; Khalatbary 2013). Entre autres, l'OLE peut protéger le cerveau contre le stress oxydatif et l'accumulation de peptide A $\beta$  (Omar 2010), puis OLE est un inhibiteur de Tau (Daccache et al. 2011). Finalement, il a été illustré au sein de neurones dopaminergiques dans un modèle de la MP *in vitro* que l'OLE est une molécule neuroprotectrice, anti-oxydante et régulatrice de l'autophagie (Achour et al. 2016) (Figure 1.19).



**Figure 1.18** Dérivés de l'OLE dans l'huile d'olive.

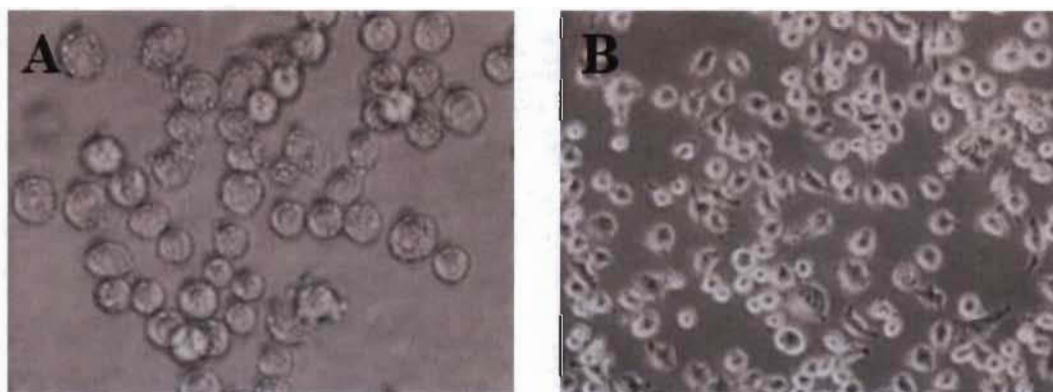


**Figure 1.19** Mécanisme d'action d'OLE (Park et al. 2017).

## 1.5 Modèles expérimentaux

### 1.5.1 Les cellules microgliales N9

Les cellules N9 sont une lignée microgliale murine qui fût immortalisée et très bien décrite par Dimayuga (2005) (Dimayuga et al. 2005) (Figure 1.20). Cette lignée cellulaire exprime les marqueurs de surfaces typiques de la microglie *in vivo*, comme les CMH I et II et les récepteurs aux cytokines. Les cellules N9 constituent le modèle que nous avons choisi pour effectuer l'ensemble des travaux expérimentaux de ce projet de maîtrise. En effet, elles sont des éléments cruciaux du système immunitaire inné du cerveau, en raison de leur capacité à phagocyter des bactéries, des débris et des cellules endommagées, ainsi qu'à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Hauwel et al. 2005). De plus, elles jouent également un rôle dans la régulation et le soutien de la fonction neuronale, puis notre laboratoire a déjà beaucoup d'expérience avec ce modèle (Bureau, Longpré, and Martinoli 2008).



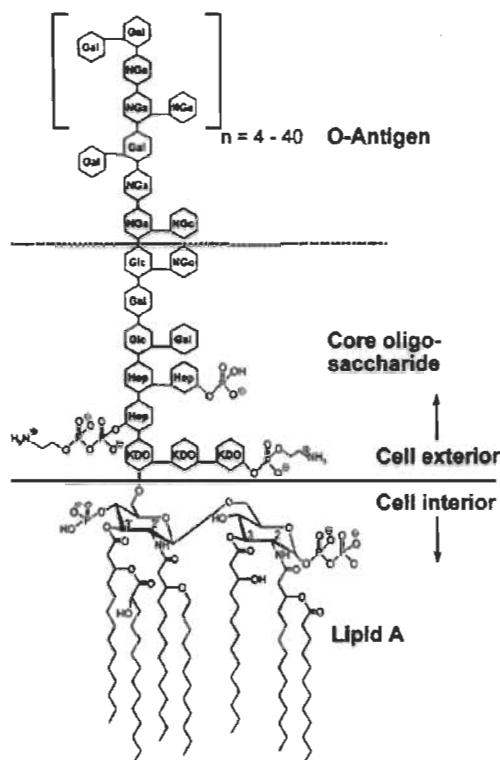
**Figure 1.20 Cellules microgliales N9.**  
A) activées (amiboïde); B) non activées.

### 1.5.2 L'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide (LPS)

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants caractéristiques de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives. Une molécule de LPS typique a une portion lipidique A, un oligosaccharide central relativement court et un polysaccharide distal (O-antigène) (Figure 1.21). Le LPS et son fragment lipidique A stimulent les cellules du



système immunitaire inné via le TLR2 et TLR4 qui reconnaissent les PAMP. L'activation de ces récepteurs entraîne la production de diverses cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6. Le LPS d'*Escherichia coli* O111: B4 est utilisé pour la stimulation, notamment des macrophages, des monocytes et des cellules gliales. Le LPS a été utilisé dans mon projet de recherche comme contrôle positif pour comparer l'efficacité inflammatoire de PA.



**Figure 1.21** Structure du LPS (Tirée de <http://www.perrin33.com>).

## 1.6 Les objectifs de recherche de ma maîtrise

L'importance de contrôler la réaction inflammatoire au niveau du SNC pour ainsi contrecarrer et/ou prévenir le déclin cognitif et la mort neuronale dans les maladies neurodégénératives est l'objectif à long terme de mon projet de recherche. En continuité avec les études déjà réalisées au sein du laboratoire de neurobiologie cellulaire de l'Université du Québec à Trois-Rivières, nous avons estimé important d'étudier pour la première fois l'inflammation induite par PA dans un modèle cellulaire de cellules



microgliales *in vitro* et de comparer la réaction inflammatoire à celle engendrée par l'administration du LPS. Ainsi, mon projet se déclinait en trois objectifs principaux :

- 1) En premier lieu, j'ai vérifié l'hypothèse que PA induit une réaction inflammatoire comparable à celle engendrée par le LPS, dans le SNC.
- 2) En second lieu, j'ai étudié les voies de signalisation de PA en les comparant à celles déjà connues du LPS, c'est-à-dire que j'ai vérifié que PA module les facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B et PA-1 via le TLR4.
- 3) Finalement, j'ai vérifié l'hypothèse que OA et OLE, deux composants de l'huile d'olive, contribuent à diminuer l'inflammation induite par PA lorsqu'ils sont administrés simultanément ou en pré-traitements.

Pour ce faire, les cellules microgliales N9 ont été traitées avec différentes concentrations de PA et LPS, notre contrôle pour vérifier l'impact de l'inflammation. Ensuite, un test de survie cellulaire, MTT, a été effectué après 3, 6, 12, 18 et 24 heures de traitement. Après avoir mis au point la concentration de traitement de PA, les niveaux de TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et IL-6, dans le milieu de culture cellulaire, ont été mesurés par ELISA. L'expression de facteurs de transcriptions pro-inflammatoires (NF- $\kappa$ B et JNK) et d'enzymes pro-inflammatoires (iNOS, COX-2) a été mesurée par western blots. L'extraction des protéines a été réalisée grâce au *Nuclear Extract Kit*. Ensuite, pour étudier la voie de signalisation de PA, des inhibiteurs du TLR4 (CLI-095) de NF- $\kappa$ B (BAY-11-7085) et de JNK (SP600125) ont été utilisés. Finalement, des pré-traitements avec OA et/ou OLE ont été effectués et les mêmes paramètres indiqués ci-haut ont été mesurés pour vérifier leur nature anti-inflammatoire.

## CHAPITRE II

### RÉGULATION DE LA NEURO-INFLAMMATION DANS LES CELLULES MICROGLIALES PAR L'ACIDE PALMITIQUE, L'ACIDE OLÉIQUE ET L'OLEUROPEÏNE

Le contenu de ce chapitre fait présentement l'objet d'une publication en anglais en voie de soumission dans la revue *Molecules*.

#### 2.1 Contribution des auteurs

L'auteur principal, Jimmy Beaulieu a réalisé l'ensemble des expériences qui font l'objet de cet article, et a rédigé une première version de l'article. Justine Renaud a fourni une aide précieuse dans la démonstration des techniques ayant servi aux différentes expérimentations. La Dre Hélène Glémet est la co-directrice de ce projet, elle a contribué au déroulement de ce projet par le matériel prodigué. La Dre Maria-Grazia Martinoli est la directrice de ce projet, elle a contribué de façon significative au déroulement de ce projet, tant avec le matériel prodigué, qu'avec ses connaissances et ses conseils judicieux. Elle est responsable du design expérimental de ce projet. Également, elle a révisé en profondeur l'article scientifique et elle s'occupera de produire la version finale pour soumission.

#### 2.2 Résumé de l'article

Récemment, plusieurs études ont établi des liens entre l'inflammation et les maladies neurodégénératives, y compris la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En outre, ils démontrent que dans plusieurs types de cellules du système immunitaire périphérique, l'acide palmitique, l'acide gras saturé le plus commun dans l'alimentation, active l'inflammation et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Le but de cette étude était d'évaluer si l'acide palmitique induit une

réaction inflammatoire dans les cellules du système nerveux central comme cela a déjà été démontré pour l'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide, une toxine inflammatoire bien connue. Notre étude a permis de démontrer, entre autres, que l'acide palmitique peut directement augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires dans un système de cellules gliales en culture. De plus, nous avons illustré que les voies de signalisation de l'acide palmitique et LPS partent des éléments communs, telles que l'activation des marqueurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 via le récepteur *toll-like* 4. Enfin, nous démontrons que l'acide oléique, un acide gras mono-insaturé, et l'oleuropéine, un polyphénol, tous deux présents dans l'huile d'olive, peuvent diminuer l'inflammation induite par l'acide palmitique. Ces résultats sont importants pour établir que l'acide palmitique, un composant de l'huile de palme, peut interférer dans l'homéostasie cellulaire du système nerveux central et suggèrent fortement qu'une alimentation riche en acide palmitique peut induire une inflammation et éventuellement favoriser le développement de maladies neurodégénératives.



## Abstract

Recently, several studies have established robust links between inflammation and neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease. In parallel, other recent research shows that in several types of cells of the peripheral immune system, palmitic acid, the most common saturated fatty acid in the diet, activates inflammation and induces the secretion of pro-inflammatory cytokines. The aim of this study was to assess whether palmitic acid induces an inflammatory reaction in the central nervous system as already demonstrated for the lipopolysaccharide (LPS) molecule, a well known bacterial inflammatory toxin. A key finding of our study is that palmitic acid can directly increase pro-inflammatory cytokines release in a microglial cellular paradigm. We also illustrate that the signaling pathways of palmitic acid and LPS in microglial cells share common elements, such as the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 transcript markers via the toll-like receptor 4. Finally, we demonstrate that the monounsaturated fatty acid, oleic acid, and a polyphenol, oleuropein, both present in olive oil, do not trigger inflammation and may decrease palmitic acid-induced cytokines secretion. These results are important to establish that palmitic acid, a component of palmitic oil, can interfere with cellular homeostasis of the central nervous system and suggest that dietary palmitic acid may induce inflammation and possibly concur in the development of neurodegeneration.

## Introduction

Recently, several studies established robust links between neurodegenerative diseases and inflammation in the central nervous system (CNS) [1]. Indeed, central inflammation occurs in multiple neurodegenerative diseases with peculiar pathology and symptoms. While the neuropathological triggers of neurodegenerative diseases are multifactorial and diverse, inflammation is nowadays accepted as a common basic feature driving to the progressive neuronal damage and death [2, 3].

Several cell types have been listed as contributors of inflammation-mediated neurodegeneration. In particular, glial cells are now regarded as key modulatory, trophic, and immune elements in the brain [4]. Actually, microglial cells and astrocytes are sensitive to inflammatory clues and become highly dynamic in response to changes in their environment. As such, they respond to the surrounding environment by expressing an activated morphology and expressing pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines, depending on the external activator stimulus [4]. Activation of glia cells is a major component of the inflammatory responses underlying brain injury and neurodegeneration [5]. For example, it has been demonstrated that in several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD), neuro-inflammation is largely mediated by activated microglia [6]. Indeed, microglial cells, derived from embryonic macrophages, induce, among other actions, the innate immune responses of the CNS via the secretion of pro-inflammatory cytokines. In AD and PD, these latter can be fundamental in the development of the specific pathology, well before the appearance of the first symptoms [2, 7]. Sustained or uncontrolled activation of microglial cells, leads to chronic inflammation that can prompt significant neuronal damage, such as a gradual loss of dopaminergic neurons of nigrostriatal pathway characteristic of PD or the slow damage of cholinergic neurons in AD [5, 8, 9]. For example, a study demonstrated, in animal models, that high levels of TNF- $\alpha$  are seen in the AD brain as compared to controls, and behavioural deficits in these models is reduced by blocking TNF- $\alpha$  [10]. This suggests that inflammatory cytokine release and its effects are closely related to AD pathology.

In parallel, recent studies indicate a specific pro-inflammatory effect of saturated fatty acids, for example palmitic acid (PA), on several cell types. PA, derived from palmitic oil, is the most prevalent saturated fatty acid in the industrialized food. According to a report by Carine *et al.* [11], people who are overweight have a higher proportion of PA among all fatty acids than those who are not overweight. This specific fatty acid has been shown to activate inflammatory signaling pathways and induces secretion of pro-inflammatory cytokines in cultured peripheral immune cells, such as macrophages and monocytes [12-14]. The effects of saturated fatty acid on brain



inflammation have not been extensively evaluated until now, but there is compelling evidence that saturated fatty acids are indeed able to alter CNS function. Fatty acids have long been known to cross the blood–brain barrier [15], and other data further suggest that high fat diets might modify physiology of astrocytes [16] and modulate amyloid processing in neurons and astrocytes [17, 18]. Other recent studies have suggested that mono- and polyunsaturated fatty acids, such as oleic acid (OA) in olive oil, may play a role in slowing the cognitive decline associated with aging or dementia [19]. However, only few studies have examined the effect of saturated and unsaturated fatty acids on microglial cells *in vitro* to better understand the role of the inflammation process and the cross-talk of signalling pathways in the central environment [20, 21].

The aim of this study was to verify whether PA induces an inflammatory reaction in the CNS similar to the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS), a well-known neuronflammatory toxin. We then attested that the signaling pathways of PA has common elements with that of LPS, such as the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 transcript markers via the toll-like receptor (TLR) 4 [22, 23]. Finally, we pretreated microglia cells with a monounsaturated fatty acid, OA, or a polyphenol, oleuropein (OLE), both present in olive oil, to validate that these two molecules may decrease inflammation induced by PA. Our results provide further insight into the glia cells contribution to SFA-associated neuroinflammation.

## **Materials and methods**

### *Drugs and Chemicals*

All reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless stated otherwise.

### *Fatty acid preparation*

Free fatty acids were complexed to fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) as described previously by Cousin et al. [22] with some minor modifications, with albumin serving as a vehicle for the free fatty acids [23]. Briefly, PA (C16:0) and OA (C18:1) were dissolved in 0.1 M NaOH using a water bath. Saturated and unsaturated fatty acids were solubilised at 70 °C and 37 °C respectively to yield a final concentration of 20 mM. Then, a 0.5 mM fatty acid free BSA solution was obtained by dissolving BSA in deionised water at 55 °C and mixed with the free fatty acids in order to reach a 1:4 BSA to fatty acid molar ratio (0.5 mM BSA, 2 mM fatty acid) [24]. The fatty acid BSA mixture was vortexed for 10 sec followed by 10 min incubation in a waterbath at 55 °C or 37 °C for saturated and unsaturated fatty acids respectively. The fatty acid-BSA complex was cooled to room temperature (4 °C) and sterilized (0.22 µm pore size membrane filter). All fatty acid-BSA complexes were stored at -20 °C prior to use.

### *Cell culture and treatments*

The microglial cell line N9 (a gift from Dr. L. Vallières, Centre de recherche, CHUL, Quebec, QC, Canada) was grown in 10% horse serum in DMEM nutrient mixture F12 Ham (DMEM-F12) and cultured in 5% CO<sub>2</sub>, as already reported [25]. Cells were treated with PA at the concentrations of 50, 75 or 100 µM. These concentrations were based on previous studies reporting free fatty acid concentrations in patients with the metabolic syndrome [26]. We also determined the cell viability in response to fatty acid treatment by dose-response and kinetic studies (data not shown). *Escherichia coli* 0111:B4 LPS (2 µg/ml), a potent inducer of inflammation and activation of microglia [6, 17], was administered as an internal control. Furthermore, OA, alone or in combination with PA (PA+OA), and OLE were used to assess potential anti-inflammatory effects on N9 cells [19, 27]. For the combination (PA+OA), OA (50, 75 or 100 µM) was administered at the same time as PA. The pretreatment with OLE was administrated 3 h before the treatment with LPS and OLE was used at 10<sup>-9</sup> M as already reported by our group [27]. For intracellular signaling studies, N9 cells were exposed to 5 µM SP600125, a specific inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK), 5 µM

BAY11-7085, a specific I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor or 5  $\mu$ M CLI-095, a specific TLR4 inhibitor, 1 h before treatment with PA or LPS [14]. All inhibitors were purchased from Enzo Life Sciences, NY, USA.

#### *MTT assay*

Cell proliferation and/or mitochondrial activity were measured using MTT (3-(4, 5-dimethyltrazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Cells, plated in 96-well plates, were treated for 24 h with three different concentrations of PA (50, 75 or 100  $\mu$ M), OA or PA+OA in combination. Then, cells were incubated for 3 h at 37 °C with MTT dye (5 mg/ml), followed by solubilisation in SDS 10% and the absorbance was measured at the 595 nm with a microplate reader (Thermo Lab Systems).

#### *ELISA*

Pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by specific ELISA kits (BioLegend, San Diego, CA). Following incubation with PA, OA, a mixture of PA and OA (PA+OA) or LPS, with or without OLE, the cell supernatants were collected after 24 h and tested for the presence of selected cytokines by ELISA, according to the protocols supplied by the manufacturer. Microwell absorbance was read at 450 nm and 560 nm with a microplate reader (Thermo Lab Systems).

#### *Measures of protein expression by western blot*

Microglial cells were seeded at 25,000 cells/cm<sup>2</sup>. Total proteins were extracted (Nuclear Extraction Kit, Active Motif, Carlsbad, CA, USA) and concentrations were determined by bicinchoninic acid quantification (BCA protein assay kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein were loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoretic separation (200 V, for 1 h), proteins were transferred onto PVDF membranes (0.22  $\mu$ m pore size, BioRad) at 25 V overnight. The membranes were blocked for 30 min and incubated overnight at 4 °C with primary

antibodies anti-phosphorylated-NF $\kappa$ B p65 (pp65), anti-c-Jun, anti-iNOS, anti-COX-2 and anti- $\beta$ -actin, (1:200, 1:500, 1:400, 1:200, and 1:4000, respectively) (Santa Cruz Biotechnology, Mississauga, ON, Canada). The blots were then incubated with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000) (Santa Cruz Biotechnology, Mississauga, ON, Canada) for 2 h at room temperature and finally developed with an enhanced chemiluminescence substrate solution (ThermoFisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Immunopositive chemiluminescent signals were visualized and analysed with the AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Densitometric blot analyses were performed using ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) software packages.  $\beta$ -actin blots served as a loading comparative standard and all immunoblotting results have been accordingly normalized to  $\beta$ -actin levels.

### *Statistical analysis*

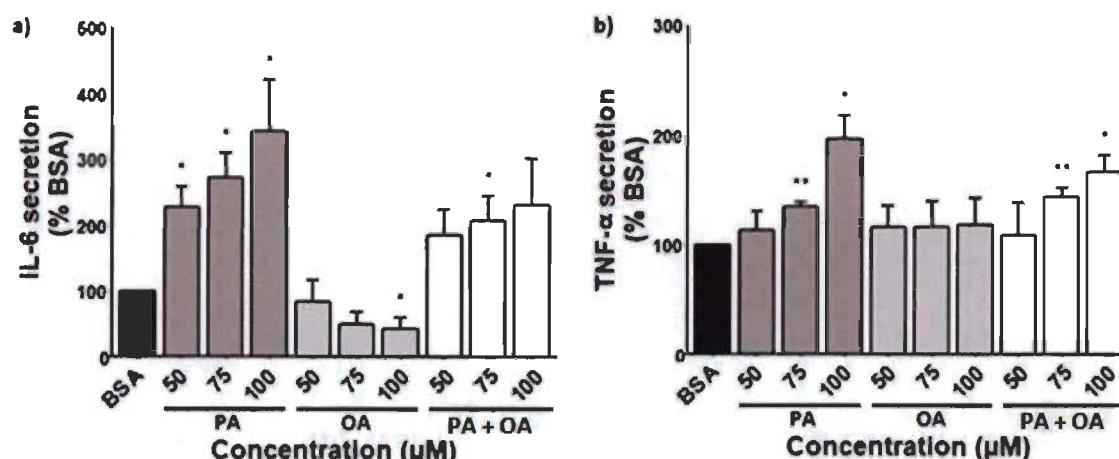
All data are shown as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Cytokine release, MTT values and western analysis were analyzed using Student's unpaired two-tailed t-test (R software) to compare difference between groups. All data, analyzed at the 95% confidence interval, are expressed as means  $\pm$  SEM, \*, \*\*, and \*\*\* represent  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively compared to controls (BSA) and #, ## and ### indicates significant  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively, decreases in expression compared with PA.

## **Results**

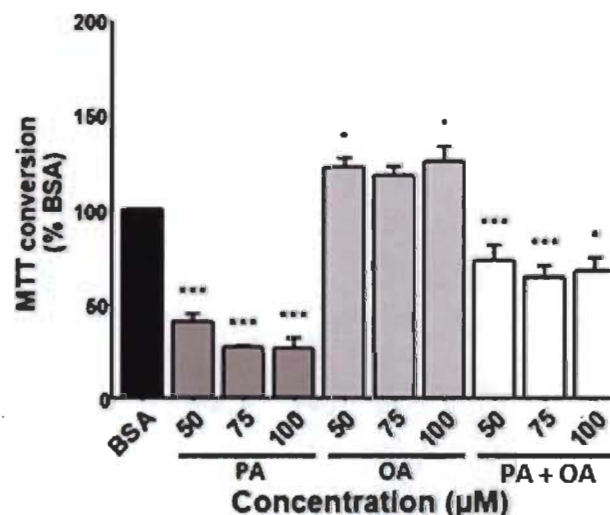
### *PA but not OA increase cytokines release*

To determine whether elevated lipid content could trigger brain inflammation, we initially evaluated the effect of the saturated fatty acid, PA, and the unsaturated fatty acid, OA, on cytokine release in a microglial cell paradigm. First, we conjugated both fatty acids to BSA as described in Materials and Methods and then we treated microglial

cells for 24 h at concentrations of 50, 75 and 100  $\mu\text{M}$ . Our results illustrate that PA induced significant dose-dependent increases of IL-6 from cultured microglial cells (**Fig. 1a**). On the contrary, OA had a limited effect on IL-6 release and, more interestingly, the co-administration of PA and OA (PA+OA) reduced significantly the secretion of the pro-inflammatory IL-6 compared to the administration of PA alone (**Fig. 1a**). **Figure 1b** shows that PA induces a clear dose-dependent TNF- $\alpha$  release, while OA does not show any effect on TNF- $\alpha$  secretion. Co-administration of PA and OA (PA+OA) sensibly reduces TNF- $\alpha$  release when compared to PA alone. In addition, PA significantly decreased MTT conversion to formazan (**Fig. 2**), suggesting that PA induced some degree of mitochondrial dysfunction or cytotoxicity. In contrast, OA did not cause cytotoxicity at any concentration used in this study (**Fig. 2**) and the co-administration of PA and OA (PA+OA) resulted in a significant lower cellular death suggesting a role for OA in protecting from PA-induced cytotoxicity.



**Fig. 1.** Effect of PA and OA and the combination of both (PA+OA) on (a) IL-6 and (b) TNF- $\alpha$  release from cultured microglial cells N9. Cells were exposed to increasing concentrations of BSA-conjugated PA or OA. Release of IL-6 and TNF- $\alpha$  was measured after 24 h. Data are represented as % control, BSA. All data are presented as mean  $\pm$  SEM for three separate experiments. \* and \*\* represent significant increases  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, in cytokine release from microglial cells treated with PA, OA and PA+OA as compared with cells treated with BSA alone.

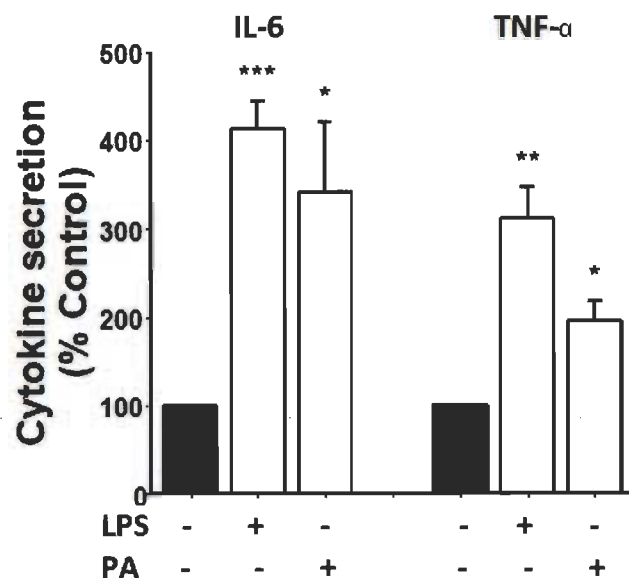


**Fig. 2.** Effect of PA and OA and the combination of both (PA+OA) on MTT conversion to formazan after 24 h in cultured microglial cells N9. Cells were exposed to increasing concentrations of BSA-conjugated PA or OA. Data are represented as % control, BSA. All data are presented as mean  $\pm$  SEM for three separate experiments. \* and \*\*\* indicate significant increases  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively, of MTT conversion to formazan in microglial cells treated with PA, OA and PA+OA as compared with cells treated with BSA alone.

#### *PA induces cytokine release from microglial cells as compared to LPS*

We also measured the inflammatory potential of PA (100  $\mu$ M). Our data shows that stimulation of microglial cells with PA resulted in a significant increase of IL-6 release by 3.4 fold compared to control (BSA) (**Fig. 3** third column) and that PA can also increase TNF- $\alpha$  release by two-fold (**Fig. 3** sixth column), thus suggesting a strong pro-inflammatory action of PA analogous to LPS. We used LPS (2  $\mu$ g/ml), a known proinflammatory cytokine inducer and activator of microglial cells [6, 17] as positive control.

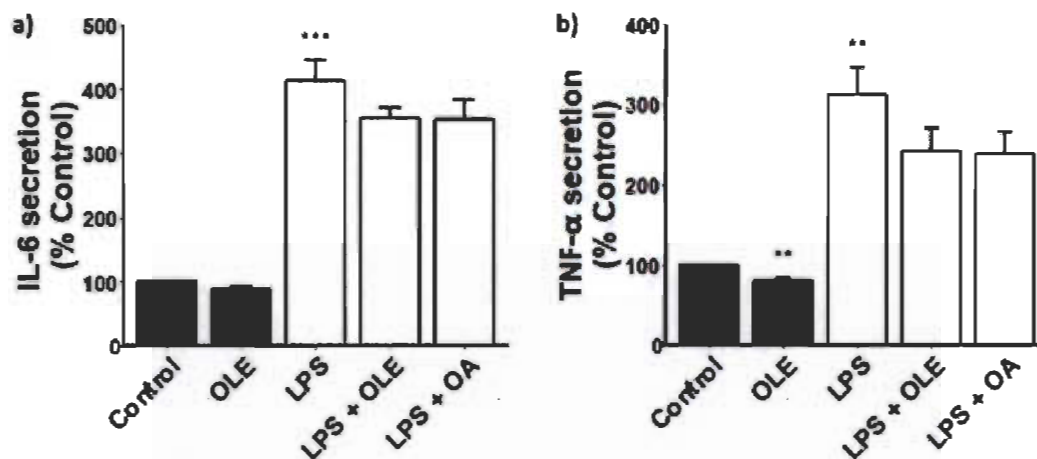




**Fig. 3.** Effect of PA or LPS on IL-6 and TNF- $\alpha$  release from cultured microglial cells N9. Cells were treated with PA (100  $\mu$ M) or LPS (2  $\mu$ g/ml). Release of cytokines was measured after 24 h. Data are represented as % control. All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. for three separate experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs. BSA or LPS control.

*Oleuropein, a soluble polyphenol, reduces TNF alpha secretion*

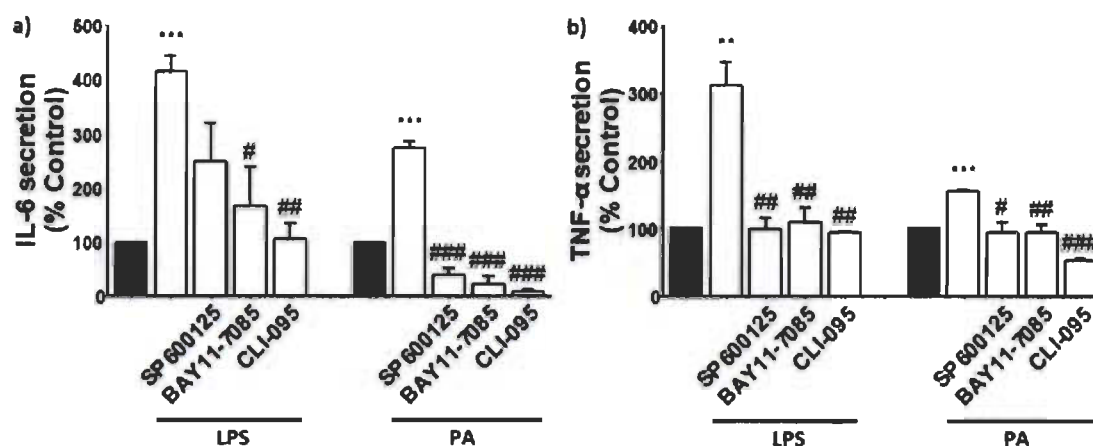
Since our previous results (**Fig. 1**) demonstrate a protective anti-inflammatory effect from OA, we decided to use another derivative of olive oil, OLE, a soluble polyphenol known to have neuroprotective effects [27]. Our results illustrate that the administration of OLE (LPS+OLE) on microglial cells, 3 h before the treatment with LPS, or the co-administration of LPS and OA (LPS+OA) resulted in appreciable but non-significant decrease of IL-6 (**Fig. 4a**). **Figure 4b** demonstrates that the administration of OLE alone could clearly decrease TNF- $\alpha$  secretion. However, the administration of OLE or OA before LPS did not induce a statistically significant decrease of TNF- $\alpha$  release (**Fig. 4b**).



**Fig. 4.** Effect of OLE and OA on IL-6 and TNF- $\alpha$  release from cultured microglial cells N9. OA (100  $\mu$ M) was co-administered with LPS. OLE (10-9 M) was administrated 3 h before the treatment with LPS (2  $\mu$ g/ml). Release of cytokines was measured after 24 h. Data are represented as % control. All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. for three separate experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control is culture medium alone.

#### *Inhibitors of JNK, NF- $\kappa$ B and TLR4 pathways, prevent PA-induced cytokine release*

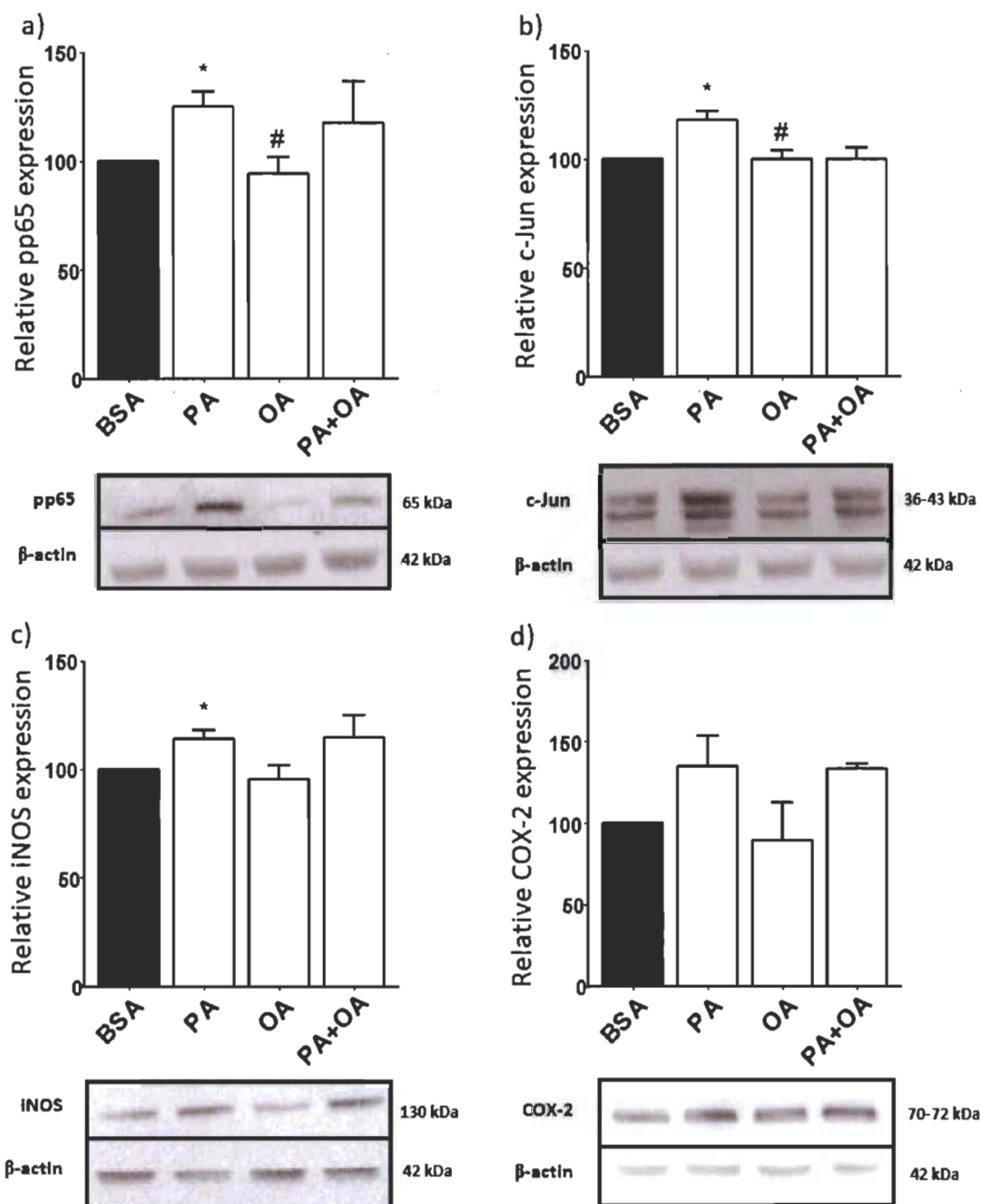
Finally, we evaluated the cellular mechanisms whereby PA increases cytokine release from microglial cells. Specific pharmacologic inhibitors of JNK (SP600125, 5  $\mu$ M), I $\kappa$ B $\alpha$  (BAY11-7085, 5  $\mu$ M) and TLR4 (CLI-095, 5  $\mu$ M), were administered to cells 1 h before PA treatment. The cytokine levels were measured after 24 h. Our results show that all three inhibitors of specific intracellular pathways were able to prevent significant release of both PA-induced IL-6 (**Fig. 5a**) and PA-induced TNF- $\alpha$  (**Fig. 5b**). In particular, PA treatment after administration of the specific pathways inhibitors results in an important decrease of IL-6 release when compared to LPS administration. Evaluation of cytotoxicity by MTT conversion to formazan did not indicate any presence of cellular death or mitochondrial dysfunction in microglial cells treated with each inhibitor (Data not shown).



**Fig. 5.** Effect of inhibitors of JNK, IκBα and TLR4 pathways on PA-induced IL-6 release and TNF-α. Microglial cells N9 were treated with PA (100 μM) or LPS (2 μg/ml) in the presence or absence of a pharmacologic inhibitor of JNK (SP600125, 5 μM), IκBα (BAY11-7085, 5 μM) and TLR4 (CLI-095, 5 μM). All inhibitors were administered to microglial cells 1 h before treatment with LPS or PA. Release of (a) IL-6 and (b) TNF-α was measured after 24 h. Data are represented as % control of BSA alone (black column) for PA (a) or culture medium for LPS (b). All data are presented as mean ± SEM for three separate experiments. \*\* and \*\*\* indicate significant increase in cytokine release from microglial cells treated with PA or LPS as compared with control cells at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. #, ## and ### indicates significant ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ) decrease in cytokine release from cells treated with PA in the presence of inhibitors as compared with cells treated with PA or LPS alone.

*PA but not OA increases expression of microglial cells pro-inflammatory markers, iNOS and COX-2*

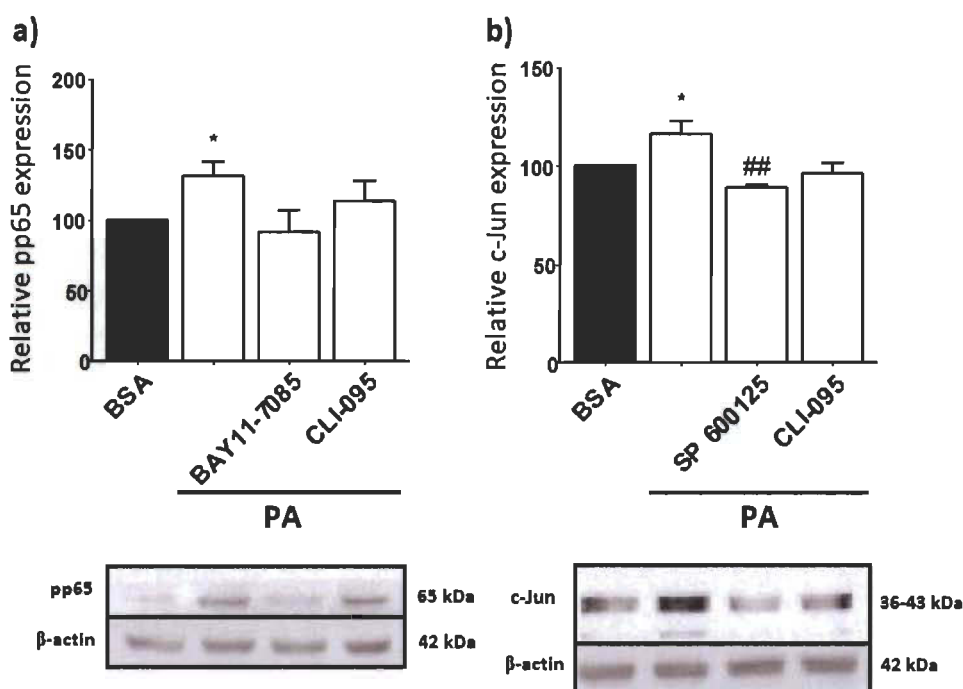
Moreover, we evaluated the effect of PA and OA on the expression of markers of pro-inflammatory signaling pathways, pp65 and c-Jun, and pro-inflammatory enzymes, iNOS and COX-2. Our results illustrate that PA induced significant increases of pp65 (**Fig. 6a**), c-Jun (**Fig. 6b**), iNOS (**Fig. 6c**) and COX-2 (**Fig. 6d**) expression after 3.5 h treatment. OA alone has no significant effect on the same markers and the co-administration of PA and OA (PA+OA) could only reduce c-jun expression and did not significantly reduce pp65, iNOS and COX-2 expression as compared to solely administration PA.



**Fig. 6.** Immunoblotting analyses illustrating increases in expression of microglial pro-inflammatory markers of (a) pp65, (b) c-Jun, (c) iNOS and (d) COX-2 as compared with  $\beta$ -actin expression in cultured microglial cells N9 after exposure to BSA, PA (100  $\mu$ M), OA (100  $\mu$ M) or PA+OA (200  $\mu$ M). Bottom panel: representative images of immunoblots. Data are represented as % control, BSA. All data are presented as mean  $\pm$  SEM from three separate experiments. \* indicates significant increase ( $p < 0.05$ ) in expression of the microglial marker treated with PA as compared with cells treated with BSA alone. # indicates significant decrease ( $p < 0.05$ ) in expression of the microglial marker pp65 and c-jun treated with OA as compared with cells treated with PA alone.

*Inhibitors of JNK, NF- $\kappa$ B and TLR4 pathways all prevent PA-induced transcription factors expression*

Our results show that PA alone significantly increase the expression of pp65 and c-jun (Fig. 7a and 7b second column). Then, we show that BAY-11-7085, which leads to the inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation results in a reduction of the PA-induced pp65 expression although not significant (Fig. 7a), while the inhibition of JNK by the inhibitor SP600125 results in a significant decrease of PA-induced c-Jun expression (Fig. 7b). Finally, the inhibitor of TLR4 pathway, CLI-095, induces a slight decrease of PA-induced pp65 and c-Jun expression (Fig. 7a and 7b, forth column), although non-significant.



**Fig. 7.** Immunoblotting analyses illustrating the expression of the microglial pro-inflammatory markers (a) pp65 and (b) c-Jun in cultured microglial cells after 3.5 h exposures to BSA or PA. Microglial cells N9 were treated with PA (100  $\mu$ M) in the presence or absence of a pharmacologic inhibitor of JNK (SP600125, 5  $\mu$ M), I $\kappa$ B $\alpha$  (BAY11-7085, 5  $\mu$ M) and TLR4 (CLI-095, 5  $\mu$ M). All inhibitors were administrated to microglial cells 1 h before administration of PA. Bottom panel: representative images of immunoblots. Data are represented as % control, BSA. All data are presented as mean  $\pm$  SEM from three separate experiments. \* indicates significant increase ( $p < 0.05$ ) in

expression of the microglial markers treated with PA, as compared with cells treated with BSA alone. ## indicates significant decrease ( $p < 0.01$ ) in expression of the microglial marker c-jun treated with PA in the presence of SP600125 as compared with cells treated with PA alone.

## Discussion

Recent literature reports that sustained or uncontrolled activation of microglial cells leads to chronic neuro-inflammation, which can prompt significant neuronal damage thus resulting in neuropathological alterations [28, 29]. In parallel, saturated fatty acids are known to activate innate immune responses in peripheral cells [12, 14, 30, 31], and to modulate amyloid processing in neurons and astrocytes of the SNC [16, 32, 33]. Nevertheless, the pro-inflammatory potential of saturated fatty acids has not been fully evaluated in microglial cells, an experimental paradigm mimicking the development of neuro-inflammation characteristic of neurodegenerative diseases with inflammatory components such as PD and AD.

In this study, we demonstrated that PA, the most common long-chain saturated fatty acid present in the Western diet, induces an important inflammatory reaction in microglial cells by increasing the release of two pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ . In addition, our data show that PA-induced secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  may be prevented by the administration of pharmacological inhibitors of JNK, NF- $\kappa$ B and TLR4 pathways, thus suggesting that PA act on these known intracellular cascades to fulfill its pro-inflammatory role. We also report that PA increases the expression of pro-inflammatory enzymes iNOS and COX-2 confirming a powerful role for PA to dysregulate intracellular homeostasis.

The CNS is exquisitely sensitive to inflammatory pathways and mediators; and metabolic dysfunctions such as obesity and high fat consumption in both humans and animals are associated with reactive gliosis and increased brain inflammation [34, 35]. Cytokines, particularly IL-6 and TNF- $\alpha$ , are major effectors of the neuroinflammatory cascade, and can disrupt neurophysiologic mechanisms involved in cognition and



memory [9]. In this study, we treated microglial cells with the saturated fatty acid, PA, or the unsaturated fatty acid, OA, to ascertain their potential pro- and anti-inflammatory effects. We demonstrated that PA induces expression and the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  from microglial cells in a dose-dependent manner while OA reduced the secretion of IL-6 dose-dependently but not the secretion of TNF- $\alpha$ .

We also demonstrated that the inhibition of TLR4, JNK and I $\kappa$ B $\alpha$  pathways decrease significantly PA-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  release, with IL-6 being much more reduced than the LPS-comparable levels (**Fig. 4**). We also illustrated that PA, but not OA, can induce an increase of the expression of markers of pro-inflammatory signaling pathways, pp65 and c-Jun, and pro-inflammatory enzymes, iNOS and COX-2. However, when PA and OA were administrated in combination in microglial cells, only c-Jun expression was reduced to control levels, while pp65 as well as iNOS and COX-2 remained at the same levels shown for PA alone, suggesting that PA acts on these intracellular cascades but not OA. As per the PA+OA action on c-Jun expression, our data do not indicate a significant modulation. Although OA could reduce IL-6 secretion levels dose dependently, there is no clear evidence that OA may act on the same intracellular cascade as PA to prevent PA inflammatory actions. As such, OA does not induce a pro-inflammatory response within microglial cells, in accordance with our results. We also illustrated that the inhibition of JNK and I $\kappa$ B $\alpha$  pathways decreases PA-induced pp65 and c-Jun expression respectively. Together, these results indicate that, in microglial cells, the effect of PA is at least in part mediated by the TLR4 as well as by the activation of AP-1 and NF- $\kappa$ B signalling pathways for pro-inflammatory cytokine secretion. AP-1 and NF- $\kappa$ B are both essential for the transcription of pro-inflammatory cytokine genes [36]. Previously, JNK has been shown to phosphorylate the c-Jun component of the transcription factor AP-1 and p65 is necessary to activate the transcription factor NF- $\kappa$ B [37]. These results are consistent with several recent studies on cells of peripheral immunity suggesting that fatty acids may activate NF- $\kappa$ B and AP-1 through activation of TLR4 [31, 38]. Overall, these data demonstrate the ability of PA to induce microglial inflammation, and thus suggest a potential role of PA in the

development of PD and AD pathogenesis both characterized by neuro-inflammation processes. The possibility that saturated fatty acids may act as a physiologically relevant endogenous ligand for TLR4 remains to be determined. According to Riera-Borrull et al. [31], saturated fatty acids can activate TLR4 through fetuin A, an adaptor protein like albumin, that mediates the interaction between saturated fatty acids and TLR4. However, it should also be noted that PA may play differently depending on target cells. For example another group [39] has recently reported that PA may trigger inflammatory responses in hypothalamic neurons partially via ceramide synthesis but not via TLR4.

Finally, we examined the anti-inflammatory properties of OLE, the major phenolic compound in olive derivatives, known for its systemic beneficial role [40] and in particular for its antiapoptotic action in a cellular model of PD [27]. Our present data illustrate that OLE could also reduce LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion levels. Although these latter results on OLE are not statistically significant, taken together our results on OA and OLE, two highly consumed compounds in the Mediterranean diet (MedDiet), complement a large number of recent scientific studies pointing out that the MedDiet plays a relevant role in preventing inflammatory diseases [41, 42]. Indeed, several clinical, epidemiological and experimental evidence suggest that consumption of a MedDiet, particularly rich in unsaturated fatty acids and phenolic compounds, may reduce the incidence of certain pathologies related to chronic inflammation, as well as oxidative stress and immune system diseases [43-45].

In conclusion, a key finding of our study is that PA shows a significant ability to directly increase the secretion of pro-inflammatory cytokines, by the activation of the transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B and mediated by the TLR4. These results apparently differ from those of previous reports [12, 14, 30, 31], as we performed experiments with CNS cells and not on cells of the peripheral system such as monocytes and macrophages. Our results using microglial cells are important as these cells share the same environment as neurons and their activation in a context of high-fat diets could be a predisposing factor in development of neurodegenerative diseases. Thus, although the maintenance of physiological levels of mono- or polyunsaturated fatty acids is

crucial for normal brain function, we propose that alterations in circulating saturated fatty acids levels can disrupt and undermine CNS function. Thus, appropriate dietary measures with specific macronutrients might open new ways for the prevention and management of the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Dr. L. M. Williams (U. Aberdeen, Scotland) and Dr. D. Sergi (U. Adelaide, Australia) for helpful discussions. This work was supported by grants from the NSERC to MGM (no. 04321) and HG (no. 227859). J.B. is a student fellow of the GRSC (UQTR). The authors have no competing financial or other conflicts of interest.

## References

1. Carson, M.J., J.C. Thrash, and B. Walter, *The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival*. Clinical neuroscience research, 2006. **6**(5): p. 237-245.
2. Block, M.L. and J.-S. Hong, *Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism*. Progress in Neurobiology, 2005. **76**(2): p. 77-98.
3. Lynch, M., *Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2010. **1**: p. 6.
4. Renaud, J., et al., *La neuro-inflammation*. Med Sci (Paris), 2015. **31**(11): p. 979-988.
5. Jha, M.K., W.-H. Lee, and K. Suk, *Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders*. Biochemical Pharmacology, 2016. **103**(Supplement C): p. 1-16.
6. Lee, S.-H. and K. Suk, *Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation*. Biochemical Pharmacology, 2017.
7. Streit, W.J. and Q.-S. Xue, *Human CNS immune senescence and neurodegeneration*. Current Opinion in Immunology, 2014. **29**: p. 93-96.
8. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's Disease: Mechanisms and Models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
9. Shabab, T., et al., *Neuroinflammation pathways: a general review*. International Journal of Neuroscience, 2017. **127**(7): p. 624-633.
10. Gabbita, S.P., et al., *Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Journal of Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 99-99.
11. Klein-Platat, C., et al., *Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents 1-3*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **82**(6): p. 1178-1184.
12. Lee, J.Y., et al., *Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(20): p. 16683-16689.
13. Laine, P.S., et al., *Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- $\kappa$ B activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **358**(1): p. 150-155.

14. Little, J.P., J.M. Madeira, and A. Klegeris, *The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation*. Journal Of Alzheimer's Disease: JAD, 2012. **30 Suppl 2**: p. S179-S183.
15. Smith, Q.R. and H. Nagura, *Fatty acid uptake and incorporation in brain*. Journal of Molecular Neuroscience, 2001. **16**(2): p. 167-172.
16. Gupta, S., et al., *Saturated Long Chain Fatty acids Activate Inflammatory Signaling in Astrocytes*. Journal of Neurochemistry, 2012. **120**(6): p. 1060-1071.
17. Duffy, C.M., et al., *Identification of a fatty acid binding protein4-UCP2 axis regulating microglial mediated neuroinflammation*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2017. **80**: p. 52-57.
18. Wang, Z., et al., *Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro*. Journal of Neuroscience Research, 2014. **92**(5): p. 574-586.
19. Fraga, V.G., et al., *Resolution of inflammation, n-3 fatty acid supplementation and Alzheimer disease: A narrative review*. Journal of Neuroimmunology, 2017. **310**(Supplement C): p. 111-119.
20. Kappe, C., et al., *GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity*. Journal of Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 276-276.
21. Valdearcos, M., et al., *Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function*. Cell reports, 2014. **9**(6): p. 2124-2138.
22. Cousin, S.P., et al., *Free Fatty Acid-Induced Inhibition of Glucose and Insulin-Like Growth Factor I-Induced Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Pancreatic  $\beta$ -Cell Line INS-1* \*\*This work was supported by grants from the NIH (GK-55267), the Juvenile Diabetes Foundation International, the German Research Society, and BetaGene, Inc. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 229-240.
23. Zindler, E. and F. Zipp, *Neuronal injury in chronic CNS inflammation*. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2010. **24**(4): p. 551-562.
24. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(11): p. 3015-3025.
25. Bureau, G., F. Longpré, and M.G. Martinoli, *Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation*. Journal of Neuroscience Research, 2008. **86**(2): p. 403-410.
26. Håversen, L., et al., *Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages*. Atherosclerosis. **202**(2): p. 382-393.

27. Achour, I., et al., *Oleuropein Prevents Neuronal Death, Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(8): p. 1293.
28. Tansey, M.G. and M.S. Goldberg, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention*. Neurobiology of disease, 2010. **37**(3): p. 510-518.
29. Barnum, C.J. and M.G. Tansey, *Neuroinflammation and Non-motor Symptoms: The Dark Passenger of Parkinson's Disease?* Current Neurology and Neuroscience Reports, 2012. **12**(4): p. 350-358.
30. Håversen, L., et al., *Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages*. Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 382-393.
31. Riera-Borrull, M., et al., *Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation*. The Journal of Immunology, 2017.
32. Patil, S., et al., *Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons*. Neuroscience Letters, 2006. **406**(1): p. 55-59.
33. Patil, S. and C. Chan, *Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons*. Neuroscience Letters, 2005. **384**(3): p. 288-293.
34. Pistell, P.J., et al., *Cognitive Impairment Following High Fat Diet Consumption is Associated with Brain Inflammation*. Journal of neuroimmunology, 2010. **219**(1-2): p. 25-32.
35. Bruce-Keller, A.J., J.N. Keller, and C.D. Morrison, *Obesity and Vulnerability of the CNS*. Biochimica et biophysica acta, 2009. **1792**(5): p. 395-400.
36. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity*. Immunological reviews, 2012. **249**(1): p. 158-175.
37. Dérjard, B., et al., *JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell. **76**(6): p. 1025-1037.
38. Huang, S., et al., *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. Journal of Lipid Research, 2012. **53**(9): p. 2002-2013.
39. Sergi, D., et al., *Hypothalamic energy balance – The impact of fatty acids and a novel G protein-coupled receptor*. Joint Annual Scientific Meeting of the Nutrition Society of New Zealand and the Nutrition Society of Australia. Wellington, N.Z, 2017(University of Aberdeen).



40. Angeloni, C., et al., *Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(11): p. 2230.
41. Gu, Y., et al., *Mediterranean Diet, Inflammatory and Metabolic Biomarkers, and Risk of Alzheimer's Disease*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2010. **22**(2): p. 483-492.
42. Solfrizzi, V., et al., *Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia*. Experimental Gerontology, 2005. **40**(4): p. 257-270.
43. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean Diet and Mild Cognitive Impairment*. Archives of neurology, 2009. **66**(2): p. 216-225.
44. Romagnolo, D.F. and O.I. Selmin, *Mediterranean Diet and Prevention of Chronic Diseases*. Nutrition Today, 2017. **52**(5): p. 208-222.
45. Casas, R., E. Sacanella, and R. Estruch, *The Immune Protective Effect of the Mediterranean Diet against Chronic Low-grade Inflammatory Diseases*. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets, 2016. **14**(4): p. 245-254.

## CHAPITRE III

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Récemment, le laboratoire de neurobiologie cellulaire dirigé par la professeure Martinoli a développé une collaboration avec la Dre Lynda M. Williams (U. Aberdeen, Écosse) pour développer des travaux de recherche sur les AG végétaux. Notre laboratoire et celui de nos collègues de l'université d'Aberdeen (Écosse) ont démontré que dans les cellules microgliales et dans les neurones hypothalamiques, certains AGI, notamment l'OA, protègent contre la toxicité induite par le PA (Sergi et al. 2017). Mon projet de maîtrise s'insère dans les présentes recherches du laboratoire de neurobiologie cellulaire de l'UQTR en collaboration avec Dre. Williams et visait, en particulier, à vérifier l'hypothèse que le PA induit une réaction inflammatoire au niveau du SNC, étant donné que le PA peut franchir la BHE (Smith and Nagura 2001). De plus, en complément de ce premier volet, je voulais étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'inflammation induite par le PA et vérifier que l'administration préventive d'un AGMI, l'OA, et d'un phytostérol, l'OLE, dérivés tous les deux de l'huile d'olive, pourrait réduire l'inflammation.

Le PA constituait l'AGS à longue chaîne de choix pour évaluer le potentiel pro-inflammatoire de ces derniers, car il est retrouvé abondamment dans l'alimentation humaine, particulièrement par l'utilisation de l'huile de palme dans les produits alimentaires industriels et comme ingrédient traditionnel des cuisines d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie. L'huile de palme est l'huile végétale la plus consommée au monde (Greenpeace 2017) et le PA représente 39,5 à 47,5 % des AG totaux qu'elle contient (CNUCED 2016). Comme déjà cité dans la sous-sous-section 1.3.1.1 de ce mémoire, l'huile de palme est énormément convoitée par l'industrie agroalimentaire à cause de ses propriétés physiques et chimiques prisées. En effet, elle est naturellement semi-solide à température ambiante, elle résiste bien à l'oxydation et rancit peu, puis son

goût est neutre. L'impact négatif de la consommation de l'huile de palme sur le taux de cholestérol chez l'homme a largement été étudié dans le passé au travers d'études cliniques (Sun et al. 2015). La conclusion de ces études nous informe que la consommation d'huile de palme entraîne un taux de *low density lipoprotein* (LDL) plus élevé que les huiles végétales pauvres en graisses saturées, donc sur la base de ses effets défavorables sur le cholestérol LDL, les graisses saturées devraient, sans aucun doute, être consommées avec retenue et remplacées par des graisses insaturées si possible. Cependant, ce n'est qu'au cours des dernières décennies que certaines études se sont intéressées aussi à son potentiel rôle pro-inflammatoire sur les tissus de notre organisme (Karmi et al. 2010; Palomer et al. 2018).

Dans mon projet de recherche, nous nous sommes également intéressés à deux composants de l'huile d'olive, car celle-ci est abondante dans la MedDiet, laquelle a déjà fait ses preuves quant à ses nombreuses vertus avérées bénéfiques sur la santé humaine, notamment pour sa nature anti-inflammatoire (Romagnolo and Selmin 2017; Casas, Sacanella, and Estruch 2016). D'une part, les AG qui composent l'huile d'olive sont majoritairement des AGMI et plus particulièrement de l'OA, d'autre part, l'intérêt que nous avons accordé à l'huile d'olive est également dû à sa forte teneur en composés phénoliques, notamment en OLE. Il s'avérerait très intéressant d'étudier le potentiel anti-inflammatoire de ces deux composants puisqu'ils sont issus du même produit de consommation, puis leur nature neuroprotectrice n'avait pas été clairement étudiée au sein des cellules gliales. De plus, un autre projet de notre laboratoire avait déjà mis en évidence le pouvoir neuroprotecteur d'OLE sur des neurones en culture, nous avons donc bénéficié de la mise au point des études cinétiques et doses-réponse avec ce polyphénol.

Dans un contexte de neuro-inflammation, les cellules microgliales s'avéraient être un modèle cellulaire de choix. Elles sont des éléments cruciaux du système immunitaire inné du cerveau en raison de leur capacité à s'activer suite à un stimulus pertinent, puis à moduler leur morphologie et leurs fonctions cellulaires. Elles peuvent ainsi phagocyter des bactéries, des débris et des cellules endommagées et sécréter des cytokines pro-

inflammatoires et anti-inflammatoires (Hauwel et al. 2005). De plus, elles jouent un rôle dans la régulation et le soutien de la fonction neuronale. Bien que les cellules microgliales ne soient pas les seules cellules de l'immunité au niveau du SNC, nous nous sommes intéressés à elles puisqu'il est déjà bien connu que ces dernières jouent un rôle majeur dans l'avènement de processus neuro-inflammatoires, puis la progression de nombreuses maladies neurodégénératives (Shabab et al. 2017) (section 1.2 de ce mémoire). De plus, notre laboratoire avait déjà beaucoup d'expérience avec le modèle de cellules microgliales N9 (Bureau, Longpré, and Martinoli 2008; Bournival et al. 2012; Renaud and Martinoli 2016). Donc, c'est ainsi que nous avons proposé pour la toute première fois, d'étudier le potentiel neuro-inflammatoire de PA et de vérifier la capacité de contrecarrer cet effet par deux molécules dérivées de l'huile d'olive au sein des cellules microgliales.

Les cellules microgliales ont d'abord été traitées avec différentes concentrations de PA et d'OA. Ensuite, un test de survie cellulaire et de cytotoxicité a été effectué après 3, 6, 12, 18 et 24 h d'incubation avec le PA et l'OA à des concentrations variant de 20 à 200  $\mu\text{M}$ . Suite aux tests de survie cellulaire et de cytotoxicité, il s'est avéré que le PA à des concentrations de 20, 30, 50, 75, 100 et 200  $\mu\text{M}$  n'induisait pas de mort cellulaire ou de dysfonction mitochondriale lorsque les cellules étaient traitées pour une durée inférieure à 12 h. Pour les mêmes concentrations, lors de traitements d'une durée de 18 h, la viabilité des cellules était légèrement atteinte de manière dose-dépendante, mais pas de manière significative. Toutefois, 24 h après le traitement avec le PA, la viabilité des cellules microgliales était significativement atteinte, et ce, de manière dose-dépendante. Ces résultats sont importants puisqu'ils indiquent que PA n'induit pas forcément la mort des cellules microgliales à de petites doses et sur une courte période de temps. Cependant PA peut activer ces cellules et induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tel que nous avons démontré par la suite. Également, la réalisation de tests de survie cellulaire a permis d'illustrer qu'OA n'induisait aucune cytotoxicité aux cellules microgliales à des concentrations variant de 20 à 200  $\mu\text{M}$  et des temps d'incubation variant entre 3 et 24h. Pour ce qui est de l'administration combinée de PA et l'OA (PA+OA), la cytotoxicité induite par le PA était diminuée par l'OA, mais de

manière non significative. À ce point, nos résultats affluaient dans le même sens que notre hypothèse, c'est-à-dire que le PA pouvait engendrer de la cytotoxicité, en plus d'induire un état d'activation des cellules, lorsqu'il était administré à des cellules microgliales en culture et qu'en revanche, l'OA n'induisait pas de cytotoxicité à aucune concentration utilisée dans notre étude. Finalement, lorsque l'OA était administré avec le PA (PA+OA), la survie cellulaire était augmentée, suggérant un rôle pour l'OA dans la protection contre la cytotoxicité induite par le PA. Cependant, les tests statistiques que nous avons utilisés n'ont pas confirmé que l'action d'OA était significative.

Après avoir mis au point les concentrations de traitements, nous avons mesuré les concentrations de cytokines pro-inflammatoires sécrétées dans le surnageant des cellules microgliales par la méthode immuno-enzymatique ELISA. Pour effectuer les tests ELISA, nous avons la contrainte de respecter une durée de traitement suffisante, soit une durée minimale d'environ 24 h, pour permettre aux cellules de synthétiser et sécréter les cytokines que nous voulions mesurées dans le milieu de culture. Suite aux tests doses-réponses et de survie cellulaire, nous avons poursuivi avec trois concentrations de traitement (50, 75 et 100  $\mu\text{M}$ ) afin d'éviter, d'une part, un taux de mortalité cellulaire non négligeable et, d'autre part, des concentrations trop faibles de cytokines par rapport à ce qui était déjà établi dans la littérature (Gupta et al. 2012; Riera-Borrull et al. 2017) et par nos collaborateurs (Sergi et al. 2017). Tel qu'illustré à la figure 1 de l'article, nous avons démontré que le PA (100  $\mu\text{M}$ ) induit une augmentation de 3,4 et 2 fois par rapport au contrôle de la sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$  respectivement, tandis qu'OA (100  $\mu\text{M}$ ) n'induit aucune augmentation, voire même une diminution de la sécrétion d'IL-6 par rapport au contrôle. De plus, l'augmentation relative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires était comparable à celle engendrée par notre contrôle, le LPS, une molécule bactérienne fortement pro-inflammatoire et très utilisée en littérature pour induire l'inflammation. À noter que notre laboratoire avait déjà beaucoup d'expériences avec le LPS et que les concentrations de traitements pour les cellules microgliales avaient été mises au point par un étudiant à la maîtrise, Alex Gélinas (Gélinas 2016). Pour ce qui est du traitement combiné de PA et OA (PA+OA), nos résultats illustrent

qu'OA ne diminue pas de manière significative la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induite par le PA.

Puisque nos tests ELISA ont été réalisés après 24 h d'incubation avec le PA (100  $\mu$ M), nous voulions nous assurer que l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par le PA était antérieure à la cytotoxicité engendrée par ce dernier. En effet, puisque nous désirions étudier les cellules microgliales dans un contexte de neuro-inflammation, il était impératif de confirmer que les cytokines pro-inflammatoires étaient induites par le PA, et non suite à la signalisation paracrine des cellules mortes dans le surnageant de culture cellulaire.

Ainsi, l'immunobuvardage de type western s'avérait nécessaire pour nous permettre de mesurer l'expression de divers médiateurs des voies de signalisation pro-inflammatoires qui sont activés très rapidement lors d'un stress cellulaire. Nous avons été à même de mesurer l'expression de pp65, c-jun, iNOS et COX-2 dans les cellules microgliales, après 3,5 h d'incubation avec le PA (100  $\mu$ M). Comme mentionné précédemment, jusqu'à 12 h de traitement, aucune mortalité n'avait été observée au sein des cellules microgliales traitées avec le PA. Nous avons démontré que le PA induisait une augmentation de l'expression des gènes des médiateurs pro-inflammatoires pp65, c-jun, iNOS et COX-2 (Figure 6 de l'article). En plus de démontrer que le PA active rapidement des médiateurs pro-inflammatoires dans les cellules microgliales, avant même d'induire de la cytotoxicité, nos résultats illustrent que le PA induit l'activation de médiateurs des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et AP-1, deux voies de signalisation induite également par le LPS (Shabab et al. 2017). Pour ce qui est d'OA, nous avons utilisé les mêmes concentrations et les temps de traitement que ceux utilisés avec le PA. Tel qu'illustré à la figure 6 de l'article, l'OA (100  $\mu$ M) n'induit pas l'expression d'aucun médiateur pro-inflammatoire. Finalement, nos résultats illustrent que lors de l'administration combinée de PA et l'OA (PA+OA), l'OA diminue seulement l'expression de c-jun, mais ne réduit pas de manière significative l'expression de pp65, iNOS et COX-2 par rapport à l'administration de PA uniquement. Ces résultats nous informent qu'OA n'a pas de rôle inflammatoire à lui seul, cependant il ne semble pas capable d'agir clairement contre l'inflammation induite par d'autres molécules.



Pour approfondir le mécanisme d'action intracellulaire de PA au sein des cellules microgliales, nous avons eu recours à trois inhibiteurs pharmacologiques pour moduler deux voies de signalisation qui activent les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1, soit un inhibiteur du TLR4, un inhibiteur de I $\kappa$ B $\alpha$  et un inhibiteur de JNK. Nous nous sommes concentrés sur les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et AP-1 (voir page 17 de ce mémoire pour une schématisation) puisqu'elles sont activées dans les processus inflammatoires et puisqu'il a déjà été démontré qu'elles sont activées par notre contrôle, le LPS (Guha and Mackman 2001). En premier lieu, nous nous sommes donc assuré que nos inhibiteurs diminuaient la sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-6 induite par le LPS (Figure 5 de l'article). En second lieu, nous avons démontré que l'inhibition du TLR4, d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de JNK diminuait de manière significative la sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-6 induite par le PA. Tel que mentionné précédemment, nous avons illustré que le PA induisait une augmentation de l'expression de pp65 et c-jun suggérant que ces deux voies sont activées par le PA. Nous avons consolidé ses résultats grâce à l'usage des inhibiteurs d'I $\kappa$ B $\alpha$  et JNK. Comme illustré à la figure 7 de l'article, nos résultats démontrent que l'inhibition d'I $\kappa$ B $\alpha$  et JNK diminue respectivement l'expression de pp65 et c-jun induite par le PA. De plus, nos résultats illustrent que la signalisation cellulaire au travers ces deux voies est médiée, entre autres, par le TLR4. En effet, l'inhibition de ce dernier diminue l'expression de pp65 et c-jun induite par le PA. Tout bien considéré, nos résultats renforcent ceux obtenus par d'autres études qui se sont intéressés à la nature pro-inflammatoire de PA sur d'autres types de cellules de l'immunité, notamment les macrophages (Riera-Borrull et al. 2017) et les astrocytes (Gupta et al. 2012) démontrant que le PA est à même d'induire l'activation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et AP-1, et ce, via le TLR4.

Finalement, après avoir étudié le potentiel pro-inflammatoire de PA sur les cellules microgliales, puis leur mécanisme d'action intracellulaire, nous nous sommes intéressés plus précisément au potentiel anti-inflammatoire de l'OLE et l'OA. Notre laboratoire avait déjà démontré, au niveau de cellules neuronales PC12 en culture, que l'OLE était une molécule neuroprotectrice, antioxydante et régulatrice de l'autophagie (Achour et al. 2016). Comme illustré à la figure 4 de l'article, un pré-traitement des cellules

microgliales d'une durée de 3 h avec l'OLE avant l'administration du LPS (LPS+OLE) ou un co-traitement avec OA (LPS+OA) diminue la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  de manière appréciable, mais non significative, selon nos tests statistiques. Ces résultats sont néanmoins très encourageants et nous prévoyons les répéter et les raffiner.

En somme, mes résultats ont permis de valider notre première hypothèse affirmant que le PA induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au sein de cellules microgliales *in vitro*. Ces résultats soutiennent ceux obtenus de nombreuses études effectuées sur d'autres cellules de l'immunité *in vitro* (Riera-Borrull et al. 2017; Gupta et al. 2012) et *in vivo* (Milanski et al. 2009). De plus, en complément de ce premier volet, nous avons illustré que le mode d'action de PA est réalisée par l'activation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et AP-1 via le TLR4, tel qu'il avait été illustré au sein des macrophages *in vitro* (Riera-Borrull et al. 2017; Little, Madeira, and Klegeris 2012). Cependant, bien que nous ayons démontré que l'OA diminue de manière non négligeable la cytotoxicité induite par PA, l'expression de c-jun induite par PA, puis la sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$  engendrée par le LPS, nos résultats n'illustrent pas qu'OA diminue de manière significative la sécrétion de cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (pp65, iNOS et COX-2) induite par le PA. Ainsi, nos résultats actuels confirment que l'OA n'agit pas en tant que pro-inflammatoire, toutefois ils ne nous permettent pas de soutenir notre deuxième hypothèse suggérant qu'OA agit comme anti-inflammatoire, notamment décrit par Palomer et ses collaborateurs (Palomer et al. 2018). À ce propos, il faudra examiner plus en profondeur l'effet de l'OA sur la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoire par les cellules microgliales et par d'autres cellules comme les astrocytes avant de conclure sur son rôle dans la neuro-inflammation.

Finalement, en ce qui a trait à l'OLE, nos résultats démontrent qu'il diminue l'expression d'IL-6 et TNF- $\alpha$  de manière non négligeable, mais non significative. Ainsi, nos résultats actuels ne peuvent appuyer ceux d'études antérieures démontrant la nature anti-inflammatoire de l'OLE au sein du SNC (Impellizzeri et al. 2012; Omar 2010; Park et al. 2017). À ce propos, il faut noter que nous avons utilisé une très petite

dose d'OLE ( $10^{-9}$  M) mis au point lors d'expérimentation de neuroprotection avec des cellules neuronales PC12 en culture. Il est possible qu'un ajustement des doses soit nécessaire afin de vérifier l'effet anti-inflammatoire d'OLE sur des cellules gliales. Néanmoins, nous suggérons que des études plus approfondies devraient être réalisées avec l'OA et l'OLE au sein des cellules microgliales puisque nos résultats sur ces deux composants restent mitigés.

Par ailleurs, même si nos résultats démontrent que le PA active le TLR4, cela n'exclut pas le fait que ce dernier pourrait activer d'autres récepteurs et voies de signalisation dans les cellules microgliales. À titre d'exemple, il a été démontré que le PA peut activer également le TLR2 dans les myoblastes *in vitro* (Senn 2006). Sachant que les TLR 1 à 9 sont exprimés constitutivement aussi bien chez la souris (Olson and Miller 2004) que chez l'homme (Jack et al. 2005), il est concevable que le TLR2 puisse être également activé au niveau des cellules microgliales. De plus, il a été démontré que les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont largement exprimés dans divers tissus et servent de ligands pour les AG (Miyamoto et al. 2016). Entre autres, les GPCR sont exprimés dans les macrophages et modulent des fonctions physiologiques telles que l'immunité et le métabolisme. En effet, les profils d'expression des GPCR diffèrent dans les macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, modulant à la hausse ou à la baisse l'expression de divers médiateurs inflammatoires. En plus des multiples récepteurs qui pourraient intervenir dans la signalisation des AG au sein des cellules gliales, plusieurs voies de signalisation peuvent aussi conduire à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, il a été illustré dans les macrophages humains *in vitro* que la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-8 était dépendante de l'activation de la voie p38, une voie activée également par le LPS (Håversen et al. 2009). Enfin, le mécanisme par lequel les AGS à longues chaînes activent les différents médiateurs pro-inflammatoires au niveau des cellules du SNC reste encore peu connu à ce jour. Selon quelques études effectuées dans les macrophages *in vivo*, ce sont les céramides, des métabolites issus du métabolisme de PA, qui induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Palomer et al. 2018; Håversen et al. 2009). En effet, le palmitoyl-CoA, la forme activée de PA, est le substrat limitant de la synthèse des

céramides *de novo*. Haversen et ses collaborateurs ont démontré que l'inhibition de l'activation de PA en palmitoyl-CoA avec la triacsine C, un inhibiteur de l'acyl-CoA synthétase, abolit l'effet de PA sur la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Quant à lui, l'OA abolit la synthèse des céramides induite par le PA dans les myoblastes en empêchant la régulation positive de la dihydrocéramide désaturase 1, l'enzyme responsable de la production de céramide à partir de son précurseur (Hu et al. 2011).

Pour les perspectives à long terme de la recherche sur l'huile de palme, il serait intéressant d'évaluer la manière dont PA pourrait moduler les effets pro-inflammatoires des toxines telles que le LPS, au sein des cellules immunitaires du SNC. Tout comme nous, Riera-Borrull et ses collaborateurs (Riera-Borrull et al. 2017) ont illustré que l'administration de PA seul provoque l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules de l'immunité. Toutefois, ils ont également démontré, dans les macrophages *in vitro*, que l'administration de PA 24 heures avant une infection au LPS d'une durée de 8 heures exacerbe les effets pro-inflammatoires de la toxine administrée seule. La capacité de PA à conditionner les macrophages ressemble à l'effet des PAMP, tel que le  $\beta$ -glucane, qui rendent les macrophages plus sensibles à une stimulation subséquente par le LPS (Netea et al. 2016). Cet effet stimulant nous conduit au concept d'immunité adaptative et démontre que les cellules immunitaires innées telles que les macrophages produisent des niveaux beaucoup plus élevés de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles ont, auparavant, été exposées à certains stimuli. Du point de vue des chercheurs, les changements détectés dans les macrophages traités avec le PA, tels que la perte de l'expression de l'ensemble des gènes anti-inflammatoires et des facteurs de transcription AhR et MAFB, sont compatibles avec l'acquisition, de la part des macrophages, d'un état conditionné avec la capacité de produire des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires lors de l'exposition à un second stimulus. D'autres chercheurs comme Haversen et ses collaborateurs (Haversen et al. 2009) ont démontré dans des macrophages *in vitro* que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  suite à l'administration de PA durant 27 h était augmentée drastiquement lorsque du LPS était ajouté 3 h après le début de l'expérience. Selon les chercheurs, les macrophages sont extrêmement sensibles au milieu extracellulaire environnant, et leur exposition à un stimulus initial détermine leurs

réponses fonctionnelles ultérieures à des stimuli supplémentaires. Ces résultats sont intéressants puisque dans un contexte d'obésité où les niveaux de PA sont augmentés également au niveau du SNC, les réponses des cellules de l'immunité pourraient être altérées pour des stimuli subséquents, expliquant l'avènement de certaines comorbidités. Également, ces résultats sont importants dans un contexte de maladies neurodégénératives, car des niveaux élevés de PA au sein du SNC pourraient intervenir et exacerber une réaction inflammatoire neuronale déjà existante.

Par la suite, il serait pertinent de reprendre les travaux avec le PA et l'OA effectués jusqu'à présent *in vitro*, puis de les reproduire *in vivo* dans un modèle de rongeurs par exemple. Plusieurs études se sont intéressées à la diète riche en graisses ou la diète riche en oméga-3, mais peu d'études se sont attardées aux effets d'une diète riche en huile de palme et/ou en huile d'olive *in vivo* sur le SNC. En premier lieu, il serait pertinent d'étudier l'état d'activation des cellules gliales des rongeurs soumis aux différentes diètes. Pour ce faire, la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires pourrait être mesurée *in vivo* par des sondes à microdialyse dans différentes zones du cerveau des rats et leur expression pourrait être mesurée par RT-PCR.

En conclusion, plusieurs études ont mis en évidence le rôle pro-inflammatoire de PA dans divers types de cellules, autant au niveau des cellules du système périphérique que celles au sein du SNC. Dans la diète nord-américaine actuelle, l'utilisation surabondante de l'huile de palme dans nos produits de consommation alimentaires est déjà reconnue pour son implication dans le développement de maladies cardiovasculaires et de cancers (Sun et al. 2015; Fattore and Fanelli 2013). Plus récemment, l'implication de PA dans les processus inflammatoires chroniques du tissu nerveux s'ajoute aux effets délétères qu'on lui attribuait. De telle sorte qu'il a été démontré au niveau des tissus adipeux (Palomer et al. 2018), la consommation constante de produits riches en PA pourrait entretenir une réaction inflammatoire au niveau du SNC, notamment par le biais de la microglie. Plutôt que de jouer un rôle protecteur comme le fait la neuro-inflammation aiguë, la neuro-inflammation chronique est le plus



souvent nuisible et dommageable pour le tissu nerveux. Cette situation est préoccupante puisque plusieurs études illustrent que l'inflammation chronique contribuerait à la progression de maladies neurodégénératives en engendrant des dommages neuronaux importants (Shabab et al. 2017).

En plus de ses effets délétères sur la santé humaine, l'opposition à l'usage de l'huile de palme est aussi grandement liée à ses répercussions sur l'environnement. Depuis les dix dernières années, la production d'huile de palme a explosé et bondi de près de 83 % (CNUCED 2016). Chaque jour, ce sont donc des milliers d'hectares qui sont brûlés pour faire pousser ces fameux palmiers à huile, faisant de cette culture l'une des principales causes de déforestation en Asie du Sud-Est, mais aussi, plus récemment, en Afrique. L'Indonésie est d'ailleurs devenue le troisième émetteur mondial de CO<sub>2</sub> à cause de ces feux de forêt. Après avoir fait brûler les forêts, les producteurs industriels optent pour la monoculture, de gigantesques surfaces sont ainsi recouvertes par les seuls palmiers. Plantes et animaux qui vivaient sur place perdent leur habitat et disparaissent à grande vitesse. L'extinction actuelle des Orangs-outans reflète le désastre. Leur population a chuté de plus de 90 % en un siècle sur l'île de Sumatra où la culture de l'huile s'est propagée.

Afin de diminuer les impacts négatifs associés à une diète axée sur l'utilisation constante de l'huile de palme telle que dans la *Western diet*, la diversification des sources d'AG et l'usage privilégié d'AGMI s'avèreraient être des pistes de solution. Selon plusieurs études épidémiologiques, la MedDiet est un modèle de diète à adopter en raison de l'usage abondant de l'huile d'olive généreuse en AGMI (15 à 25 %), pauvre en AGS (moins de 8 %) et riche en phénols. Des études ont même mis de l'avant que la consommation de l'huile d'olive en particulier, atténue le déclin et améliore les fonctions cognitives (Solfrizzi et al. 2006; Berr et al. 2009).

Dans cette optique, nos résultats utilisant des cellules microgliales sont importants, car ces cellules partagent le même environnement que les neurones et leur activation dans un contexte de régimes riches en graisses pourrait être un facteur prédisposant au



développement de maladies neurodégénératives à caractère inflammatoire comme pour la MA et la MP. Ainsi, bien que le maintien des niveaux physiologiques d'AGMI ou AGPI soit crucial pour le fonctionnement normal du cerveau, nous proposons que des élévations d'AGS à longue chaîne puissent perturber et compromettre la fonction du SNC et que des mesures diététiques appropriées avec des macronutriments spécifiques puissent ouvrir de nouvelles voies pour la prévention et la gestion de la pathogenèse des maladies neurodégénératives.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour, Imène, Anne-Marie Arel-Dubeau, Justine Renaud, Manon Legrand, Everaldo Attard, Marc Germain, and Maria-Grazia Martinoli. 2016. 'Oleuropein Prevents Neuronal Death, Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model', *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1293.
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2011. 'Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras', *ANSES, Alimentation, Environnement, Travail*.
- Ajami, Bahareh, Jami L. Bennett, Charles Krieger, Wolfram Tetzlaff, and Fabio M. V. Rossi. 2007. 'Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life', *Nature Neuroscience*, 10: 1538.
- Ajuwon, Kolapo M., and Michel E. Spurlock. 2005. 'Palmitate Activates the NF- $\kappa$ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF $\alpha$  Expression in 3T3-L1 Adipocytes', *The Journal of Nutrition*, 135: 1841-46.
- Alarcón, Rodrigo, Carolina Fuenzalida, Marcos Santibáñez, and Rommy von Bernhardt. 2005. 'Expression of Scavenger Receptors in Glial Cells: Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound  $\beta$ -Amyloid', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 30406-15.
- Alves, Guido, Elin Bjelland Forsaa, Kenn Freddy Pedersen, Michaela Dreetz Gjerstad, and Jan Petter Larsen. 2008. 'Epidemiology of Parkinson's disease', *Journal of Neurology*, 255: 18-32.
- Amtul, Zareen, David Westaway, F. Cechetto David, and F. Rozmahel Richard. 2010. 'Oleic Acid Ameliorates Amyloidosis in Cellular and Mouse Models of Alzheimer's Disease', *Brain Pathology*, 21: 321-29.
- Angeloni, Cristina, Marco Malaguti, Maria Cristina Barbalace, and Silvana Hrelia. 2017. 'Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection', *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 2230.
- Anstey, K. J., N. Cherbuin, M. Budge, and J. Young. 2011. 'Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies', *Obesity Reviews*, 12: e426-e37.

- ASPC. 2016. "Quel est l'état de santé des Canadiens?" In, edited by Agence de la santé publique du Canada.
- Astrup, Arne, Louise Ryan, Gary K. Grunwald, Mette Storgaard, Wim Saris, Ed Melanson, and James O. Hill. 2007. 'The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies', *British Journal of Nutrition*, 83: S25-S32.
- Bach, A. C., and V. K. Babayan. 1982. 'Medium-chain triglycerides: an update', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 36: 950-62.
- Baumann, Nicole, and Danielle Pham-Dinh. 2001. 'Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System', *Physiological Reviews*, 81: 871-927.
- Bechmann, Ingo, Ian Galea, and V. Hugh Perry. 2007. 'What is the blood–brain barrier (not)?', *Trends in Immunology*, 28: 5-11.
- Ben-Shachar, Dorit, Roza Zuk, and Yelena Glinka. 2002. 'Dopamine Neurotoxicity: Inhibition of Mitochondrial Respiration', *Journal of Neurochemistry*, 64: 718-23.
- Bergman, Richard N., and Marilyn Ader. 2000. 'Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11: 351-56.
- Berr, Claudine, Florence Portet, Isabelle Carriere, Tasmine Akbaraly, Catherine Feart, Véronique Gourlet, Nicole Combe, Pascale Barberger-Gateau, and Karen Ritchie. 2009. 'Olive Oil and Cognition: Results from the Three-City Study', *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28: 357-64.
- Block, Michelle L., and Jau-Shyong Hong. 2005. 'Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism', *Progress in Neurobiology*, 76: 77-98.
- Boche, D., V. H. Perry, and J. A. R. Nicoll. 2012. 'Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39: 3-18.
- . 2013. 'Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39: 3-18.
- Bogie, Jeroen F. J., Piet Stinissen, and Jerome J. A. Hendriks. 2014. 'Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis', *Acta Neuropathologica*, 128: 191-213.

- Bournival, Julie, Marilyn Plouffe, Justine Renaud, Cindy Provencher, and Maria-Grazia Martinoli. 2012. 'Quercetin and Sesamin Protect Dopaminergic Cells from MPP(+)-Induced Neuroinflammation in a Microglial (N9)-Neuronal (PC12) Coculture System', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012: 921941.
- Bourre, Jean-Marie, Odile Daudu, and Nicole Baumann. 1976. 'Nervonic acid biosynthesis by erucyl-coa elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and polyunsaturated)', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 424: 1-7.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1994. 'Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder', *Neurobiology of Aging*, 15: 355-56.
- Bruce-Keller, Annadora J., Jeffrey N. Keller, and Christopher D. Morrison. 2009. 'Obesity and Vulnerability of the CNS', *Biochimica et biophysica acta*, 1792: 395-400.
- Bureau, Genevieve, Fanny Longpré, and M. G. Martinoli. 2008. 'Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation', *Journal of Neuroscience Research*, 86: 403-10.
- Businaro, Rita, Flora Ippoliti, Serafino Ricci, Nicoletta Canitano, and Andrea Fusco. 2012. 'Alzheimer's Disease Promotion by Obesity: Induced Mechanisms; Molecular Links and Perspectives', *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2012: 13.
- Cai, Dongsheng. 2013. 'Neuroinflammation and Neurodegeneration in Overnutrition-induced Diseases', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24: 40-47.
- Capurso, A., F. Panza, V. Solfrizzi, C. Capurso, A. D'Introno, S. Capurso, and A. M. Colacicco. 2004. 'Monounsaturated Fatty Acids and Neuroprotection. The Results of a Study of Cognitive Decline in Old Age. Is There a Case for this Treatment in Multiple Sclerosis?' in Otto R. Hommes and Giancarlo Comi (eds.), *Early Indicators Early Treatments Neuroprotection in Multiple Sclerosis* (Springer Milan: Milano).
- Carrero, I., M. R. Gonzalo, B. Martin, J. M. Sanz-Anquela, J. Arévalo-Serrano, and A. Gonzalo-Ruiz. 2012. 'Oligomers of beta-amyloid protein (A $\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain', *Experimental Neurology*, 236: 215-27.

- Carrillo, C., M. <sup>a</sup> M. Cavia, and S. Alonso-Torre. 2012. 'Role of oleic acid in immune system; mechanism of action: a review', *Nutrición Hospitalaria*, 27: 978-90.
- Casas, Rosa, Emilio Sacanella, and Ramon Estruch. 2016. 'The Immune Protective Effect of the Mediterranean Diet against Chronic Low-grade Inflammatory Diseases', *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 14: 245-54.
- Chaudhuri, K. Ray, Daniel G. Healy, and Anthony H. V. Schapira. 2006. 'Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management', *The Lancet Neurology*, 5: 235-45.
- Chavez, Jose Antonio, Trina A. Knotts, Li-Ping Wang, Guibin Li, Rick T. Dobrowsky, Gregory L. Florant, and Scott A. Summers. 2003. 'A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 10297-303.
- Chen, Shau-Kwaun, Petr Tvrdik, Erik Peden, Scott Cho, Sen Wu, Gerald Spangrude, and Mario R. Capecchi. 2010. 'Hematopoietic Origin of Pathological Grooming in Hoxb8 Mutant Mice', *Cell*, 141: 775-85.
- Christophe, Wersinger, and Sidhu Anita. 2002. 'Inflammation and Parkinsons Disease', *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 1: 221-42.
- CM, Tanner. 2003. 'Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies', *Adv Neurol*. 2003;91: 133-42.
- CNUCED. 2016. 'Huile de palme'.
- Daccache, Anthony, Cedric Lion, Nathalie Sibille, Melanie Gerard, Christian Slomianny, Guy Lippens, and Philippe Cotelle. 2011. 'Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors', *Neurochemistry International*, 58: 700-07.
- Daneman, Richard, and Alexandre Prat. 2015. 'The Blood–Brain Barrier', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7: a020412.
- Dauer, William, and Serge Przedborski. 2003. 'Parkinson's Disease: Mechanisms and Models', *Neuron*, 39: 889-909.
- De Pablo Manuel, A., and Álvarez De Cienfuegos Gerardo. 2000. 'Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions', *Immunology and Cell Biology*, 78: 31-39.

- Delgado, Graciela E., Bernhard K. Krämer, Stefan Lorkowski, Winfried März, Clemens von Schacky, and Marcus E. Kleber. 2017. 'Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study', *Journal of Clinical Lipidology*, 11: 126-35.e5.
- Deumens, Ronald, Arjan Blokland, and Jos Prickaerts. 2002. 'Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway', *Experimental Neurology*, 175: 303-17.
- Dimayuga, Filomena O., Janelle L. Reed, Genevieve A. Carnero, Chunmei Wang, Edgardo R. Dimayuga, Vanessa M. Dimayuga, Andrea Perger, Melinda E. Wilson, Jeffrey N. Keller, and Annadora J. Bruce-Keller. 2005. 'Estrogen and brain inflammation: Effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines', *Journal of neuroimmunology*, 161: 123-36.
- Duff, Karen, Chris Eckman, Cindy Zehr, Xin Yu, Cristian-Mihail Prada, Jordi Perez-tur, Mike Hutton, Luc Buee, Yasuo Harigaya, Debra Yager, David Morgan, Marcia N. Gordon, Leigh Holcomb, Lawrence Refolo, Brenda Zenk, John Hardy, and Steven Younkin. 1996. 'Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1', *Nature*, 383: 710.
- Ehlers, Mario R. W. 2000. 'CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity', *Microbes and Infection*, 2: 289-94.
- Engelhart, M. J., M. I. Geerlings, A. Ruitenbergh, J. C. van Swieten, A. Hofman, J. C. M. Witteman, and M. M. B. Breteler. 2002. 'Diet and risk of dementia: Does fat matter?', *Neurology*, 59: 1915.
- Entin-Meer, Michal, Xiaodong Yang, Scott R. VandenBerg, Kathleen R. Lamborn, Abraham Nudelman, Ada Rephaeli, and Daphne Adele Haas-Kogan. 2007. 'In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas', *Neuro-Oncology*, 9: 82-88.
- Farina, Cinthia, Francesca Aloisi, and Edgar Meinl. 2007. 'Astrocytes are active players in cerebral innate immunity', *Trends in Immunology*, 28: 138-45.
- Fattore, Elena, and Roberto Fanelli. 2013. 'Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64: 648-59.
- Fraga, Vanessa Gomes, Maria das Graças Carvalho, Paulo Caramelli, Lirlândia Pires de Sousa, and Karina Braga Gomes. 2017. 'Resolution of inflammation, n-3 fatty acid supplementation and Alzheimer disease: A narrative review', *Journal of neuroimmunology*, 310: 111-19.



- Frank-Cannon, Tamy C., Laura T. Alto, Fiona E. McAlpine, and Malú G. Tansey. 2009. 'Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?', *Molecular Neurodegeneration*, 4: 47.
- Frühbeis, Carsten, Dominik Fröhlich, Wen Ping Kuo, Jesa Amphornrat, Sebastian Thilemann, Aiman S. Saab, Frank Kirchhoff, Wiebke Möbius, Sandra Goebels, Klaus-Armin Nave, Anja Schneider, Mikael Simons, Matthias Klugmann, Jacqueline Trotter, and Eva-Maria Krämer-Albers. 2013. 'Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication', *PLoS Biology*, 11: e1001604.
- G, McKhann, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, and Stadlan EM. 1984. 'Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease', *Neurology. Jul; 34(7):939-44*.
- Galic, Michael A., Kiarash Riazi, and Quentin J. Pittman. 2012. 'Cytokines and brain excitability', *Frontiers in neuroendocrinology*, 33: 116-25.
- Gate, David, Kavon Rezai-Zadeh, Dominique Jodry, Altan Rentsendorj, and Terrence Town. 2010. 'Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity', *Journal of Neural Transmission*, 117: 961-70.
- Gélinas, Alex. 2016. 'Étude de l'effet neuroprotecteur d'un nouveau polyphénol, l'épsilon-viniférine, dans un modèle cellulaire de la maladie de Parkinson', Mémoire, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada.
- Gerhard, Alexander, Nicola Pavese, Gary Hotton, Federico Turkheimer, Meltem Es, Alexander Hammers, Karla Eggert, Wolfgang Oertel, Richard B. Banati, and David J. Brooks. 2006. 'In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease', *Neurobiology of disease*, 21: 404-12.
- GG, Glenner, Wong CW, Quaranta V, and Eanes ED. 1984. 'The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis', *Appl Pathol. 1984; 2(6): 357-69*.
- Ghanbari, Rahele, Farooq Anwar, Khalid M. Alkharfy, Anwarul-Hassan Gilani, and Nazamid Saari. 2012. 'Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)-A Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 3291-340.

- Gimsa, Ulrike, N. Avrion Mitchison, and Monika C. Brunner-Weinzierl. 2013. 'Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation', *Mediators of Inflammation*, 2013: 320519.
- Giulian, D., and J. E. Ingeman. 1988. 'Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia', *The Journal of Neuroscience*, 8: 4707.
- Glass, Christopher K., Kaoru Saijo, Beate Winner, Maria Carolina Marchetto, and Fred H. Gage. 2010. 'Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration', *Cell*, 140: 918-34.
- Gomez Perdiguero, Elisa, Kay Klapproth, Christian Schulz, Katrin Busch, Emanuele Azzoni, Lucile Crozet, Hannah Garner, Celine Trouillet, Marella F. de Bruijn, Frederic Geissmann, and Hans-Reimer Rodewald. 2014. 'Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors', *Nature*, 518: 547.
- Gonçalves-de-Albuquerque, Cassiano Felipe, Isabel Matos Medeiros-de-Moraes, Flora Magno de Jesus Oliveira, Patrícia Burth, Patrícia Torres Bozza, Mauro Velho Castro Faria, Adriana Ribeiro Silva, and Hugo Caire de Castro-Faria-Neto. 2016. 'Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis', *PLoS ONE*, 11: e0153607.
- Gordon, Siamon. 2002. 'Pattern Recognition Receptors', *Cell*, 111: 927-30.
- Granucci, Francesca, Filippo Petralia, Matteo Urbano, Stefania Citterio, Francesco Di Tota, Laura Santambrogio, and Paola Ricciardi-Castagnoli. 2003. 'The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia', *Blood*, 102: 2940.
- Greenpeace. 2017. 'L'huile de palme'.
- Gu, Yian, Jose A. Luchsinger, Yaakov Stern, and Nikolaos Scarmeas. 2010. 'Mediterranean Diet, Inflammatory and Metabolic Biomarkers, and Risk of Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 22: 483-92.
- Guha, Mausumee, and Nigel Mackman. 2001. 'LPS induction of gene expression in human monocytes', *Cellular Signalling*, 13: 85-94.
- Gupta, Sunita, Alecia G. Knight, Shruti Gupta, Jeffrey N. Keller, and Annadora J. Bruce-Keller. 2012. 'Saturated Long Chain Fatty acids Activate Inflammatory Signaling in Astrocytes', *Journal of Neurochemistry*, 120: 1060-71.

- Gwinn-Hardy, Katrina. 2002. 'Genetics of parkinsonism', *Movement Disorders*, 17: 645-56.
- Hanke, Mark L., and Tammy Kielian. 2011. 'Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential', *Clinical science (London, England: 1979)*, 121: 367-87.
- Hauwel, Mathieu, Emeline Furon, Cecile Canova, Mark Griffiths, Jim Neal, and Philippe Gasque. 2005. 'Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal endependymal cells', *Brain Research Reviews*, 48: 220-33.
- Håversen, Liliana, Kristina Norén Danielsson, Linda Fogelstrand, and Olov Wiklund. 2009. 'Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages', *Atherosclerosis*, 202: 382-93.
- Hirsch, Etienne C., and Stéphane Hunot. 2009. 'Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?', *The Lancet Neurology*, 8: 382-97.
- Hirtz, D., D. J. Thurman, K. Gwinn-Hardy, M. Mohamed, A. R. Chaudhuri, and R. Zalutsky. 2007. 'How common are the "common" neurologic disorders?', *Neurology*, 68: 326.
- Hoehn MM, Yahr MD. 1998. 'Parkinsonism: onset, progression, and mortality', *Neurology*. 1998 Feb;50(2): 318.
- Hu, Frank B., Meir J. Stampfer, JoAnn E. Manson, Alberto Ascherio, Graham A. Colditz, Frank E. Speizer, Charles H. Hennekens, and Walter C. Willett. 1999. 'Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 1001-08.
- Hu, Wei, Jessica Ross, Tuoyu Geng, Sarah E. Brice, and L. Ashley Cowart. 2011. 'Differential Regulation of Dihydroceramide Desaturase by Palmitate versus Monounsaturated Fatty Acids: Implications for insulin resistance', *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 16596-605.
- Huang, Shurong, Jennifer M. Rutkowski, Ryan G. Snodgrass, Kikumi D. Ono-Moore, Dina A. Schneider, John W. Newman, Sean H. Adams, and Daniel H. Hwang. 2012. 'Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways', *Journal of Lipid Research*, 53: 2002-13.

- Hwang, Daniel H., Jeong- A. Kim, and Joo Young Lee. 2016. 'Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid', *European Journal of Pharmacology*, 785: 24-35.
- Hyunkyoung, Lee, Lee Soojin, Cho Ik-Hyun, and Lee Sung Joong. 2013. 'Toll-Like Receptors: Sensor Molecules for Detecting Damage to the Nervous System', *Current Protein & Peptide Science*, 14: 33-42.
- Impellizzeri, Daniela, Emanuela Esposito, Emanuela Mazzon, Irene Paterniti, Rosanna Di Paola, Placido Bramanti, Valeria Maria Morittu, Antonio Procopio, Enzo Perri, Domenico Britti, and Salvatore Cuzzocrea. 2012. 'The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice', *Biochemical Pharmacology*, 83: 1413-26.
- Jack, Carolyn S., Nathalie Arbour, Joshua Manusow, Vivianne Montgrain, Manon Blain, Ellie McCrea, Aaron Shapiro, and Jack P. Antel. 2005. 'TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes', *The Journal of Immunology*, 175: 4320.
- Jäger, Anneli, Valérie Dardalhon, Raymond A. Sobel, Estelle Bettelli, and Vijay K. Kuchroo. 2009. 'Th1, Th17 and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183: 7169-77.
- Jankowsky, Joanna L., and Paul H. Patterson. 1999. 'Cytokine and Growth Factor Involvement in Long-Term Potentiation', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 14: 273-86.
- Janssens, Sophie, and Rudi Beyaert. 2002. 'A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling', *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 474-82.
- Jouvène, Charlotte. 2016. 'Caractérisation de métabolites oxygénés dérivés des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat', Thèse de doctorat de l'Université de Lyon.
- Kalmijn, Sandra, J. Launer Lenore, Alewijn Ott, C. M. Witteman Jacqueline, Albert Hofman, and M. B. Breteler Monique. 2004. 'Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam study', *Annals of Neurology*, 42: 776-82.
- Kamata, Hideaki, Shi-ichi Honda, Shin Maeda, Lufen Chang, Hajime Hirata, and Michael Karin. 2005. 'Reactive Oxygen Species Promote TNF $\alpha$ -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases', *Cell*, 120: 649-61.

- Karmi, Anna, Patricia Iozzo, Antti Viljanen, Jussi Hirvonen, Barbara A. Fielding, Kirsi Virtanen, Vesa Oikonen, Jukka Kemppainen, Tapio Viljanen, Letizia Guiducci, Merja Haaparanta-Solin, Kjell Någren, Olof Solin, and Pirjo Nuutila. 2010. 'Increased Brain Fatty Acid Uptake in Metabolic Syndrome', *Diabetes*, 59: 2171-77.
- Kern, Philip A., Subramanian Ranganathan, Chunling Li, Linda Wood, and Gouri Ranganathan. 2001. 'Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280: E745-E51.
- Keys, Ancel. 1980. 'Coronary Heart Disease, Serum Cholesterol, and the Diet', *Acta Medica Scandinavica*, 207: 153-60.
- Khalatbary, Ali Reza. 2013. 'Olive oil phenols and neuroprotection', *Nutritional Neuroscience*, 16: 243-49.
- Kielian, Tammy. 2006. 'Toll-Like Receptors in Central Nervous System Glial Inflammation and Homeostasis', *Journal of Neuroscience Research*, 83: 711-30.
- Kim, Jeong Yeon, Hyun Jik Lee, Sei-Jung Lee, Young Hyun Jung, Dae Young Yoo, In Koo Hwang, Je Kyung Seong, Jung Min Ryu, and Ho Jae Han. 2017. 'Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid- $\beta$  production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  and Akt/NF- $\kappa$ B pathways', *Scientific Reports*, 7: 4335.
- Kim Seung, U., and Jean de Vellis. 2005. 'Microglia in health and disease', *Journal of Neuroscience Research*, 81: 302-13.
- Kim, Yoon Seong, and Tong H. Joh. 2006. 'Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease', *Experimental & Molecular Medicine*, 38: 333.
- Kusakabe, Takashi, Masahiro Maeda, Nobuo Hoshi, Takashi Sugino, Kazuo Watanabe, Takeaki Fukuda, and Toshimitsu Suzuki. 2000. 'Fatty Acid Synthase Is Expressed Mainly in Adult Hormone-sensitive Cells or Cells with High Lipid Metabolism and in Proliferating Fetal Cells', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48: 613-22.
- Laine, Phyllis S., Eric A. Schwartz, Yingjie Wang, Wei-Yang Zhang, Sheetal K. Karnik, Nicolas Musi, and Peter D. Reaven. 2007. 'Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- $\kappa$ B activation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358: 150-55.

- Lee, Joo Y., Kyung H. Sohn, Sang H. Rhee, and Daniel Hwang. 2001. 'Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 16683-89.
- Lee, Sun-Hwa, and Kyoungho Suk. 2017. 'Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation', *Biochemical Pharmacology*.
- Legrand, Philippe, Daniel Catheline, Marie-Claire Fichot, and Philippe Lemarchal. 1997. 'Inhibiting  $\Delta 9$ -Desaturase Activity Impairs Triacylglycerol Secretion in Cultured Chicken Hepatocytes', *The Journal of Nutrition*, 127: 249-56.
- Legrand, Philippe, Daniel Catheline, Vincent Rioux, and Georges Durand. 2002. 'Lauric acid is desaturated to 12:1n-3 by hepatocytes and rat liver homogenates', *Lipids*, 37: 569-72.
- Legrand, Philippe, and Vincent Rioux. 2010. 'The Complex and Important Cellular and Metabolic Functions of Saturated Fatty Acids', *Lipids*, 45: 941-46.
- Little, Jonathan P., Jocelyn M. Madeira, and Andis Klegeris. 2012. 'The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation', *Journal Of Alzheimer's Disease: JAD*, 30 Suppl 2: S179-S83.
- Lopez-Miranda, Jose, Javier Delgado-Lista, Pablo Perez-Martinez, Yolanda Jimenez-Gómez, Francisco Fuentes, Juan Ruano, and Carmen Marin. 2007. 'Olive oil and the haemostatic system', *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 1249-59.
- Luchsinger, J. A., M. Tang, S. Shea, and R. Mayeux. 2002. 'Caloric intake and the risk of alzheimer disease', *Archives of Neurology*, 59: 1258-63.
- MacKichan, Mary Lee, and Anthony L. DeFranco. 1999. 'Role of Ceramide in Lipopolysaccharide (LPS)-induced Signaling: LPS increases ceramide rather than acting as a structural homolog', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 1767-75.
- McDonough, Ashley, Richard V. Lee, and Jonathan R. Weinstein. 2017. 'Microglial Interferon Signaling and White Matter', *Neurochemical Research*, 42: 2625-38.
- McGeer, Patrick L., and Edith G. McGeer. 2008. 'Glial reactions in Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 23: 474-83.



- McGuire, Susan O., Zao Dung Ling, Jack W. Lipton, Caryl E. Sortwell, Timothy J. Collier, and Paul M. Carvey. 2001. 'Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Is Toxic to Embryonic Mesencephalic Dopamine Neurons', *Experimental Neurology*, 169: 219-30.
- McKimmie, Clive S., and John K. Fazakerley. 2005. 'In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression', *Journal of neuroimmunology*, 169: 116-25.
- Meraz Rios, Marco Antonio, Danira Toral-Rios, Diana Franco-Bocanegra, Juana Villeda-Hernández, and Victoria Campos-Peña. 2013. 'Inflammatory process in Alzheimer's Disease', *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7: 59.
- Milanski, Marciane, Giovanna Degasperi, Andressa Coope, Joseane Morari, Raphael Denis, Dennys E. Cintra, Daniela M. L. Tsukumo, Gabriel Anhe, Maria E. Amaral, Hilton K. Takahashi, Rui Curi, Helena C. Oliveira, José B. C. Carvalheira, Silvana Bordin, Mário J. Saad, and Lício A. Velloso. 2009. 'Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity', *The Journal of Neuroscience*, 29: 359.
- Mitsui, Hiroshi, Takahiro Watanabe, Hidehisa Saeki, Katsunori Mori, Hideki Fujita, Yayoi Tada, Akihiko Asahina, Koichiro Nakamura, and Kunihiro Tamaki. 2004. 'Differential Expression and Function of Toll-like Receptors in Langerhans Cells: Comparison with Splenic Dendritic Cells', *Journal of Investigative Dermatology*, 122: 95-102.
- Miyamoto, Junki, Mayu Kasubuchi, Akira Nakajima, and Ikuo Kimura. 2016. 'Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Free Fatty Acid Receptors'.
- Mizuno Y, Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Mori H, Shimura H, Kubo S, Kobayashi H, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. 2001. 'Familial Parkinson's disease. Alpha-synuclein and parkin', *Adv Neurol*. 2001; 86: 13-21.
- Montgomery, Sara L., Michael A. Mastrangelo, Diala Habib, Wade C. Narrow, Sara A. Knowlden, Terry W. Wright, and William J. Bowers. 2011. 'Ablation of TNF-RI/RII Expression in Alzheimer's Disease Mice Leads to an Unexpected Enhancement of Pathology: Implications for Chronic Pan-TNF- $\alpha$  Suppressive Therapeutic Strategies in the Brain', *The American Journal of Pathology*, 179: 2053-70.
- Morris, M., D. A. Evans, J. L. Bienias, and et al. 2003. 'Dietary fats and the risk of incident alzheimer disease', *Archives of Neurology*, 60: 194-200.

- Morris, M., D. A. Evans, C. C. Tangney, and et al. 2006. 'Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline', *Archives of Neurology*, 63: 1085-88.
- Mrak, Robert E., and W. Sue T. Griffin. 2005. 'Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration', *Neurobiology of Aging*, 26: 349-54.
- Mukhopadhyay, Subhankar, and Siamon Gordon. 2004. 'The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity', *Immunobiology*, 209: 39-49.
- Müller, Franz-Josef, Evan Y. Snyder, and Jeanne F. Loring. 2006. 'Gene therapy: can neural stem cells deliver?', *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 75.
- Nagatsu, Toshi, and Makoto Sawada. 2006. 'Cellular and Molecular Mechanisms of Parkinson's Disease: Neurotoxins, Causative Genes, and Inflammatory Cytokines', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26: 779-800.
- Nakagawa, Yutaka, and Kenji Chiba. 2014. 'Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases', *Pharmaceuticals*, 7.
- Netea, Mihai G., Leo A. B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H. G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A. J. O'Neill, and Ramnik J. Xavier. 2016. 'Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease', *Science (New York, N.Y.)*, 352: aaf1098-aaf98.
- Newell, Elizabeth A., Brittany P. Todd, Jolonda Mahoney, Andrew A. Pieper, Polly J. Ferguson, and Alexander G. Bassuk. 2018. 'Combined Blockade of Interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  Signaling Protects Mice from Cognitive Dysfunction after Traumatic Brain Injury', *eNeuro*, 5: ENEURO.0385-17.2018.
- Nicolia, Vincenzina, Marco Lucarelli, and Andrea Fusco. 2015. 'Environment, epigenetics and neurodegeneration: Focus on nutrition in Alzheimer's disease', *Experimental Gerontology*, 68: 8-12.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, and Fritjof Helmchen. 2005. 'Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo', *Science*, 308: 1314.

- Nosaka, Naohisa, Hideaki Maki, Yoshie Suzuki, Hirofumi Haruna, Atsushi Ohara, Michio Kasai, Hiroaki Tsuji, Toshiaki Aoyama, Mitsuko Okazaki, Osamu Igarashi, and Kazuo Kondo. 2003. 'Effects of Margarine Containing Medium-chain Triacylglycerols on Body Fat Reduction in Humans', *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 10: 290-98.
- Oda, Kanae, and Hiroaki Kitano. 2006. 'A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network', *Molecular Systems Biology*, 2: 2006.0015-2006.0015.
- Olson, Julie K., and Stephen D. Miller. 2004. 'Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs', *The Journal of Immunology*, 173: 3916.
- Omar, Syed Haris. 2010. 'Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive', *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ*, 18: 111-21.
- Opie, Lionel H., and Paul G. Walfish. 1963. 'Plasma Free Fatty Acid Concentrations in Obesity', *New England Journal of Medicine*, 268: 757-60.
- Ousman, Shalina S., and Paul Kubes. 2012. 'Immune surveillance in the central nervous system', *Nature Neuroscience*, 15: 1096.
- Palomer, Xavier, Javier Pizarro-Delgado, Emma Barroso, and Manuel Vázquez-Carrera. 2018. 'Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29: 178-90.
- Panza, F., V. Solfrizzi, A. M. Colacicco, A. D'Introno, C. Capurso, F. Torres, A. Del Parigi, S. Capurso, and A. Capurso. 2007. 'Mediterranean diet and cognitive decline', *Public Health Nutrition*, 7: 959-63.
- Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Scianni, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, Tiago Alves Ferreira, Eva Guiducci, Laura Dumas, Davide Ragozzino, and Cornelius T. Gross. 2011. 'Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development', *Science*, 333: 1456.
- Park, Junghyung, Ju-Sik Min, Unbin Chae, Joon Yeop Lee, Kyung-Sik Song, Hyun-Shik Lee, Hong Jun Lee, Sang-Rae Lee, and Dong-Seok Lee. 2017. 'Anti-inflammatory effect of oleuropein on microglia through regulation of Drp1-dependent mitochondrial fission', *Journal of neuroimmunology*, 306: 46-52.
- Parnet, Patricia, Keith W. Kelley, Rose-Marie Bluthé, and Robert Dantzer. 2002. 'Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior', *Journal of neuroimmunology*, 125: 5-14.

- Patil, Sachin, and Christina Chan. 2005. 'Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons', *Neuroscience letters*, 384: 288-93.
- Petersson, Sara Danuta, and Elena Philippou. 2016. 'Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia: A Systematic Review of the Evidence', *Advances in Nutrition*, 7: 889-904.
- Petit, Valérie, Isabelle Niot, Hélène Poirier, and Philippe Besnard. 2007. 'Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes', *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21: 38-45.
- Pickup, John C., Gary D. Chusney, Stephen M. Thomas, and Davina Burt. 2000. 'Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor  $\alpha$  and blood cytokine production in type 2 diabetes', *Life Sciences*, 67: 291-300.
- Pistell, Paul J., Christopher D. Morrison, Sunita Gupta, Alecia G. Knight, Jeffrey N. Keller, Donald K. Ingram, and Annadora J. Bruce-Keller. 2010. 'Cognitive Impairment Following High Fat Diet Consumption is Associated with Brain Inflammation', *Journal of neuroimmunology*, 219: 25-32.
- PL, McGeer, Itagaki S, and McGeer EG. 1988. 'Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease', *Acta Neuropathol.* 1988; 76(6): 550-7.
- Ramsauer, Markus, Dorothee Krause, and Rolf Dermietzel. 2002. 'Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes', *The FASEB Journal*, 16: 1274-76.
- Ransohoff, Richard M., and Britta Engelhardt. 2012. 'The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system', *Nature Reviews Immunology*, 12: 623.
- Ransohoff, Richard M., Andrzej Glabinski, and Marie Tani. 1996. 'Chemokines in immune-mediated inflammation of the central nervous system', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7: 35-46.
- Re, Fabio, Svetlana L. Belyanskaya, Richiard J. Riese, Barbara Cipriani, Falko R. Fischer, Francesca Granucci, Paola Ricciardi-Castagnoli, Celia Brosnan, Lawrence J. Stern, Jack L. Strominger, and Laura Santambrogio. 2002. 'Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces an Expression Program in Neonatal Microglia That Primes Them for Antigen Presentation', *The Journal of Immunology*, 169: 2264.

- Reaven, Gerald M., Clarie Hollenbeck, Chii-Yang Jeng, Min Shung Wu, and Yii-Der Ida Chen. 1988. 'Measurement of Plasma Glucose, Free Fatty Acid, Lactate, and Insulin for 24 h in Patients With NIDDM', *Diabetes*, 37: 1020.
- Renaud, Justine, and Maria-Grazia Martinoli. 2016. 'Development of an Insert Co-culture System of Two Cellular Types in the Absence of Cell-Cell Contact', *JoVE*: e54356.
- Renaud, Justine, Hélène-Marie Th  rien, Marilyn Plouffe, and Maria-Grazia Martinoli. 2015. 'La neuro-inflammation', *Med Sci (Paris)*, 31: 979-88.
- Riera-Borrull, Marta, Víctor D. Cuevas, Bárbara Alonso, Miguel A. Vega, Jorge Joven, Elena Izquierdo, and   ngel L. Corb  . 2017. 'Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation', *The Journal of Immunology*.
- Rigacci, Stefania, and Massimo Stefani. 2016. 'Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans', *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 843.
- Rioux, Vincent, Philippe Lemarchal, and Philippe Legrand. 2000. 'Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11: 198-207.
- Rock, R. B., S. Hu, A. Deshpande, S. Munir, B. J. May, C. A. Baker, P. K. Peterson, and V. Kapur. 2005. 'Transcriptional response of human microglial cells to interferon-  ', *Genes And Immunity*, 6: 712.
- Rolli, Malvyne, Alexey Kotlyarov, Kathleen M. Sakamoto, Matthias Gaestel, and Armin Neninger. 1999. 'Stress-induced Stimulation of Early Growth Response Gene-1 by p38/Stress-activated Protein Kinase 2 Is Mediated by a cAMP-responsive Promoter Element in a MAPKAP Kinase 2-independent Manner', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 19559-64.
- Romagnolo, Donato F., and Ornella I. Selmin. 2017. 'Mediterranean Diet and Prevention of Chronic Diseases', *Nutrition Today*, 52: 208-22.
- Rosa, Casas, Estruch Ramon, and Sacanella Emilio. 2018. 'The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses', *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18: 23-35.
- Rotshenker, Shlomo. 2003. 'Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease', *Journal of Molecular Neuroscience*, 21: 65-72.



- Sabroe, Ian, Steven K. Dower, and Moira K. B. Whyte. 2005. 'The Role of Toll-Like Receptors in the Regulation of Neutrophil Migration, Activation, and Apoptosis', *Clinical Infectious Diseases*, 41: S421-S26.
- Salas-Salvadó, J., M. Bulló, R. Estruch, and et al. 2014. 'Prevention of diabetes with mediterranean diets: A subgroup analysis of a randomized trial', *Annals of Internal Medicine*, 160: 1-10.
- Schapira, A. H. V. 2004. 'Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease- a critical appraisal', *Movement Disorders*, 9: 125-38.
- Sengupta, Shomik, G. Muir Jane, and R. Gibson Peter. 2006. 'Does butyrate protect from colorectal cancer?', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21: 209-18.
- Senn, Joseph J. 2006. 'Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 26865-75.
- Sergi, Dominico, A.C. Morris, M-G Martinoli, J.E. Drew, and L.M. Williams. 2017. 'Hypothalamic energy balance – The impact of fatty acids and a novel G protein-coupled receptor', *Joint Annual Scientific Meeting of the Nutrition Society of New Zealand and the Nutrition Society of Australia. Wellington, N.Z.*
- Serra-Majem, Lluís, Blanca Roman, and Ramón Estruch. 2008. 'Scientific Evidence of Interventions Using the Mediterranean Diet: A Systematic Review', *Nutrition Reviews*, 64: S27-S47.
- Shabab, Tara, Ramin Khanabdali, Soheil Zorofchian Moghadamtousi, Habsah Abdul Kadir, and Gokula Mohan. 2017. 'Neuroinflammation pathways: a general review', *International Journal of Neuroscience*, 127: 624-33.
- Sharp, Frank R., Stephen M. Massa, and Raymond A. Swanson. 1999. 'Heat-shock protein protection', *Trends in Neurosciences*, 22: 97-99.
- Shi, Hang, Maia V. Kokoeva, Karen Inouye, Iphigenia Tzamelis, Huali Yin, and Jeffrey S. Flier. 2006. 'TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance', *Journal of Clinical Investigation*, 116: 3015-25.
- Singh, Raja B., Sushma A. Mengi, Yan-Jun Xu, Amarjit S. Arneja, and Naranjan S. Dhalla. 2002. 'Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process', *Experimental & Clinical Cardiology*, 7: 40-53.



- Sisodia, S. S., S. H. Kim, and G. Thinakaran. 1999. 'Function and dysfunction of the presenilins', *American Journal of Human Genetics*, 65: 7-12.
- Smith, Quentin R., and Hiroshi Nagura. 2001. 'Fatty acid uptake and incorporation in brain', *Journal of Molecular Neuroscience*, 16: 167-72.
- Solfrizzi, Vincenzo, Anna Maria Colacicco, Alessia D'Introno, Cristiano Capurso, Francesco Torres, Caterina Rizzo, Antonio Capurso, and Francesco Panza. 2006. 'Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: A 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging', *Neurobiology of Aging*, 27: 1694-704.
- Solfrizzi, Vincenzo, Alessia D'Introno, Anna M. Colacicco, Cristiano Capurso, Angelo Del Parigi, Sabrina Capurso, Annamaria Gadaleta, Antonio Capurso, and Francesco Panza. 2005. 'Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia', *Experimental Gerontology*, 40: 257-70.
- Staiger, Harald, Katrin Staiger, Norbert Stefan, Hans Günther Wahl, Fausto Machicao, Monika Kellerer, and Hans-Ulrich Häring. 2004. 'Palmitate-Induced Interleukin-6 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells', *Diabetes*, 53: 3209.
- Streit, Wolfgang J. 2001. 'Microglia and Macrophages in the Developing CNS', *NeuroToxicology*, 22: 619-24.
- Sun, Ye, Nithya Neelakantan, Yi Wu, Rashmi Lote-Oke, An Pan, and Rob M. van Dam. 2015. 'Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials', *The Journal of Nutrition*, 145: 1549-58.
- Tai, M. H., S. S. Chirala, and S. J. Wakil. 1993. 'Roles of Ser101, Asp236, and His237 in catalysis of thioesterase II and of the C-terminal region of the enzyme in its interaction with fatty acid synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 1852-56.
- Takeshita, Yukio, and Richard M. Ransohoff. 2012. 'Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier (BBB): Chemokine regulation and in vitro models', *Immunological reviews*, 248: 228-39.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Ciriati, P. Cohen, and M. J. Comb. 1996. 'FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2', *The EMBO Journal*, 15: 4629-42.

- Tang, Daolin, Rui Kang, Carolyn B. Coyne, Herbert J. Zeh, and Michael T. Lotze. 2012. 'PAMPs and DAMPs: Signal Os that Spur Autophagy and Immunity', *Immunological reviews*, 249: 158-75.
- Thaler, Joshua P., Chun-Xia Yi, Ellen A. Schur, Stephan J. Guyenet, Bang H. Hwang, Marcelo O. Dietrich, Xiaolin Zhao, David A. Sarruf, Vitaly Izgur, Kenneth R. Maravilla, Hong T. Nguyen, Jonathan D. Fischer, Miles E. Matsen, Brent E. Wisse, Gregory J. Morton, Tamas L. Horvath, Denis G. Baskin, Matthias H. Tschöp, and Michael W. Schwartz. 2012. 'Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans', *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 153-62.
- Tremblay, Marie-Ève, Beth Stevens, Amanda Sierra, Hiroaki Wake, Alain Bessis, and Axel Nimmerjahn. 2011. 'The Role of Microglia in the Healthy Brain', *The Journal of Neuroscience*, 31: 16064.
- Urpi-Sarda, Mireia, Rosa Casas, Gemma Chiva-Blanch, Edwin Saúl Romero-Mamani, Palmira Valderas-Martínez, Sara Arranz, Cristina Andres-Lacueva, Rafael Llorach, Alex Medina-Remón, Rosa M. Lamuela-Raventos, and Ramon Estruch. 2012. 'Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis', *Pharmacological Research*, 65: 577-83.
- Valdearcos, Martin, Megan M. Robblee, Daniel I. Benjamin, Daniel K. Nomura, Allison W. Xu, and Suneil K. Koliwad. 2014. 'Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function', *Cell reports*, 9: 2124-38.
- Visintin, Alberto, Alessandra Mazzoni, Jessica H. Spitzer, David H. Wyllie, Steven K. Dower, and David M. Segal. 2001. 'Regulation of Toll-Like Receptors in Human Monocytes and Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 166: 249.
- Wadachi, R., and K. M. Hargreaves. 2006. 'Trigeminal Nociceptors Express TLR-4 and CD14: a Mechanism for Pain due to Infection', *Journal of dental research*, 85: 49-53.
- Wake, Hiroaki, Philip R. Lee, and R. Douglas Fields. 2011. 'Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials', *Science (New York, N.Y.)*, 333: 1647-51.
- Wang, Zhen, Dexiang Liu, Qun Zhang, Jianmei Wang, Jingmin Zhan, Xiuying Xian, Zhaoxia Du, Xueer Wang, and Aijun Hao. 2014. 'Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro', *Journal of Neuroscience Research*, 92: 574-86.

- Watkins, Linda R., Steven F. Maier, and Lisa E. Goehler. 1995. 'Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms', *Life Sciences*, 57: 1011-26.
- Weigert, Cora, Katrin Brodbeck, Harald Staiger, Christiana Kausch, Fausto Machicao, Hans U. Häring, and Erwin D. Schleicher. 2004. 'Palmitate, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induces the Expression of Interleukin-6 in Human Myotubes through Proteasome-dependent Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 23942-52.
- Wen, Xiaojun, Lijiao Xiao, Zhuoyan Zhong, Limin Wang, Ze Li, Xiaoping Pan, and Zhonglin Liu. 2017. 'Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells', *Oncotarget*, 8: 69370-85.
- Weston, Claire R., and Roger J. Davis. 2002. 'The JNK signal transduction pathway', *Current Opinion in Genetics & Development*, 12: 14-21.
- Westwick, John K., Alicja E. Bielawska, Ghassan Dbaibo, Yusuf A. Hannun, and David A. Brenner. 1995. 'Ceramide Activates the Stress-activated Protein Kinases', *Journal of Biological Chemistry*, 270: 22689-92.
- Whitton, P. S. 2007. 'Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease', *British Journal of Pharmacology*, 150: 963-76.
- Wilson Craig, J., E. Finch Caleb, and J. Cohen Harvey. 2008. 'Cytokines and Cognition-The Case for A Head-to-Toe Inflammatory Paradigm', *Journal of the American Geriatrics Society*, 50: 2041-56.
- Xu, W. L., A. R. Atti, M. Gatz, N. L. Pedersen, B. Johansson, and L. Fratiglioni. 2011. 'Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study', *Neurology*, 76: 1568-74.
- Yang, Myung-Soon, Jung Park Eun, Seonghyang Sohn, Jae Kwon Hyuk, Won-Ho Shin, Kyung Pyo Han, Byungkwan Jin, Sook Choi Kyeong, Ilo Jou, and Eun-Hye Joe. 2002. 'Interleukin-13 and -4 induce death of activated microglia', *Glia*, 38: 273-80.